



# Voies de signalisation des MAP kinases et apoptose chez l'éponge *Suberites domuncula* et la moule *Mytilus galloprovincialis*

Amélie Châtel

## ► To cite this version:

Amélie Châtel. Voies de signalisation des MAP kinases et apoptose chez l'éponge *Suberites domuncula* et la moule *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2009. Français. NNT : . tel-01068372

**HAL Id: tel-01068372**

**<https://theses.hal.science/tel-01068372>**

Submitted on 25 Sep 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA MATIERE, DE L'INFORMATION  
ET DE LA SANTE**

# Voies de signalisation des MAP kinases et apoptose chez l'éponge *Suberites domuncula* et la moule *Mytilus galloprovincialis*

Thèse soutenue par

**Amélie CHÂTEL**

**Le 7 décembre 2009**

En vue de l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale**

**Rapporteurs :           Professeur Georgia BARLOVATZ-MEIMON**  
**Docteur Nicole DEVAUCHELLE**

**Examineurs :**

**Professeur Germaine DORANGE**  
**Professeur Werner MÜLLER**  
**Docteur Hélène TALARMIN**

## **Remerciements**

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de culture cellulaire, composante de l'EA 4326 « Facteurs nerveux et structuration tissulaire » de l'Université de Bretagne Occidentale ainsi qu'à l' « Institut für Physiologische Chemie » de l'université de Mainz, en Allemagne.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Germaine Dorange, ma directrice de thèse, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir dirigé ce travail. Elle a su m'apporter encouragements et réconfort aux moments où j'en avais le plus besoin. Je lui témoigne ma profonde gratitude ainsi qu'à Hélène Talarmin, qui ont toutes deux su m'orienter vers la bonne voie et je les remercie sincèrement de leurs précieux conseils et remarques constructives qu'elles m'ont prodigués.

Je remercie également le Pr. Maxime Gioux de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Physiologie.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Pr. Werner Müller pour m'avoir accueillie à Mainz avec son enthousiasme permanent, qui m'a permis de m'intégrer facilement et de travailler dans les meilleures conditions. Je le remercie d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse et lui exprime toute ma reconnaissance.

Enfin, je ne saurais oublier Bojan Hamer, qui m'a permis d'avoir une collaboration originale avec la Croatie. Je lui exprime ma gratitude pour son soutien aussi bien sur le plan professionnel en me faisant profiter de sa compétence, que sur le plan personnel, par sa gentillesse.

Mes remerciements vont également à tous les membres du jury pour avoir bien voulu accepter de juger cet ouvrage.

Enfin, à l'issue de ce travail, je tiens à exprimer ma reconnaissance et remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont su m'apporter leur aide et leur soutien, contribuant ainsi à l'aboutissement de ce travail : l'équipe de Brest, en particulier, Julie, Houda, Ulysse, Christelle, Nicolas, Mickaël, Nicholas et Jérémy ; ainsi que celle de Mainz, en particulier Sasha, Michael, Barbél, Nino, Maggie, Mugdha, Matthias et bien d'autres encore.

J'ai une forte pensée pour les membres de ma famille, qui ont su garder patience et m'encourager pour mener à bien mon projet.

## Abréviations

### A

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ARN	Acide RiboNucléique
ASK1	Apoptosis Signal regulating Kinase 1
ATF1	Activating Transcription Factor 1

### B

Bad	Bcl-2 associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCIP	5-Bromo 4-Chloro-3 Indolyl Phosphate
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BEt	Bromure d'Etidium
BH	Bcl-2 Homology Domain
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	Bcl2-interacting killer
Bim	Bcl2-interacting mediator of cell death
BLK	B Lymphoid tyrosine Kinase
Bmf	Bcl2 modifying factor
BPA	BisPhenol A
BPC	BiPhényls polyChlorés

### C

Cdc42	Cell division cycle 42
CDK	Cyclin Dependent Kinase
COX 2	CycloOXygenase 2

CREB	cAMP Responsive Element Binding protein
CSBP	Cytokine Synthesis anti-inflammatory drug Binding Protein

## **D**

DR	Death Receptor
DRC	Domaines Riches en Cystéine

## **E**

EDC	Endocrine Disrupting Chemicals
EGF	Epidermal Growth Factor
Elk1	ETS oncogene family 1
Endo G	Endonuclease G
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ETS1	Signal dependent Transcriptional regulator 1

## **F**

FADD	Fas-Associated Death Domain
FasL	Fas Ligand
FGF	Fibroblast Growth Factor

## **H**

HAP	Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques
HBP1	HMG-Box transcription factor 1
HOG1	High Osmolarity Glycerol responsive 1
HSF	Heat Shock Factor
HSP	Heat Shock Protein

## **I**

IL1	Interleukine 1
iNOS	inductible Nitric Oxide Synthase

## **J**

JIP	JNK-Interacting Protein
JNK	Jun-N(amino) terminal Kinase

## **K**

Krs	Kinase responsive stress
KRS	Kinase suppressor of Ras

## **M**

MAPK	Mitogen-Activated Protein kinase
MAPKAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase
MCP	Mort Cellulaire Programmée
MEF	MEK Enhancing Kinase
MEK	MAP Kinase Kinase
MKP	MAP Kinase Phosphatase
MLK	member of the Mixed-Lineage Kinase
MNK	MAP Kinase-interacting serine/threonine kinase
MSK	Mitogen-Stress-activated protein Kinase

## **N**

NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NGF	Neuronal Growth Factor
NGFR	NGF Receptor

## **P**

PARP	PolyADP Ribose Polymerase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCNA	Proloferation Cellular Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PPLA2	PhosPhoLipase A2

## **R**

RK	Reactivating Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
RSK	Ribosomal S6 Kinase
RT PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RTK	Recepteur tyrosine kinase

## **S**

Sap1	pro SAPosine
SAPK	Stress-Activated Protein kinase
SRF	Serum-Response Factor
STAT 1	Signal Transducer and Activator of Transcription
STE20	Serine Thréonine kinase 20

## **T**

TAB	TAK-Associated Binding protein
TAK	TGF $\beta$ Activated Kinase
TBT	TriButyléTain
TCF	Ternary Complex Factor

TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF Recepteur
Tpl2	Tumor progression locus 2
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAF	TNF-Associated Factor
TRAIL	TNF-Realted Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Receptor



# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

<b>1. <u>Voies de signalisation des MAP kinases et apoptose</u></b> .....	1
<b>1.1. Bilan des connaissances chez les Mammifères</b> .....	2
1.1.1. Voies des MAP kinases .....	2
1.1.2. Apoptose .....	13
<b>1.2. Etat des connaissances chez l'éponge et la moule</b> .....	18
1.2.1. Voies des MAP kinases .....	18
1.2.2. Apoptose .....	20
<b>2. <u>Animaux et sites de prélèvement</u></b> .....	21
2.1. Espèces cibles .....	21
2.2. Sites de prélèvement .....	22
<b>3. <u>Polluants testés en laboratoire</u></b> .....	27
<b>4. <u>Objectif de l'étude</u></b> .....	33

## MATERIEL ET METHODES

<b>I. Matériel biologique</b> .....	35
1.1. L'éponge <i>Suberites domuncula</i> .....	35
1.2. La moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	35
<b>II. Composés testés</b> .....	37
2.1. Lipopolysaccharides bactériens .....	37
2.2. Composé organométallique : le tributylétain (TBT) .....	37
2.3. Peroxyde d'hydrogène .....	38
2.4. Hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs) .....	38
<b>III. Méthodes</b> .....	38
<b>3.1. Traitement des animaux</b> .....	38
<b>3.2. Extraction protéique</b> .....	39
<b>3.3. Dosage protéique</b> .....	39
<b>3.4. Développement d'un test ELISA indirect pour la mesure de l'activation des MAP kinases</b> .....	39
<b>3.5. Mesure de l'expression de Bcl-x L/S par Western blot</b> .....	40
<b>3.6. Mesure de la génotoxicité par le test fluorométrique ou Fast microméthod®</b> .....	41
<b>3.7. Mesure de l'activation de la caspase 3</b> .....	42
<b>3.8. Etude histologique</b> .....	43
3.8.1. Coloration hémalum/éosine .....	43
3.8.2. Mesure de la fragmentation d'ADN par la méthode TUNEL .....	43

<b>3.9. Séquençage des MAP kinases chez la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i></b> .....	44
<b>3.10. Analyse statistique des données</b> .....	51

## **CHAPITRE 1 : L'éponge *Suberites domuncula*, comme modèle d'étude**

<b>I. Introduction</b> .....	53
<b>II. Résultats</b> .....	59
1. Développement d'un test ELISA pour la mesure des MAP kinases .....	59
1.1. P38 .....	59
1.2. JNK et de ERK .....	59
2. Effet de polluants du milieu marin sur la voie des MAPKs .....	60
<b>III. Discussion / Conclusion</b> .....	63
1. Mise en place du test ELISA – Précautions .....	63
2. Application du test ELISA pour les essais toxicologiques .....	63

## **CHAPITRE 2 : La moule *Mytilus galloprovincialis*, comme modèle d'étude**

<b>I. Introduction</b> .....	73
<b>II. Résultats</b> .....	76
1. Etude en laboratoire .....	76
2. Etude <i>in situ</i> .....	90
<b>III. Discussion / Conclusion</b> .....	91

<b>DISCUSSION/CONCLUSION</b> .....	100
------------------------------------	-----

## **ANNEXE 1**

## **ANNEXE 2**

## **ANNEXE 3**

## **BIBLIOGRAPHIE**



# INTRODUCTION

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'un partenariat entre l'EA 4326 « Facteurs nerveux et structuration tissulaire » - Université de Bretagne Occidentale, l'« Institut für Physiologische Chemie » - Université de Mainz (Allemagne) et le « Ruder Bošković Institute », à Rovinj (Croatie). Il a pour objectif de développer des biomarqueurs permettant d'évaluer l'impact de xénobiotiques sur des espèces marines provenant de sites plus ou moins pollués de la côte adriatique ou exposés au laboratoire au tributylétain (TBT) et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Les espèces cibles sont la moule *Mytilus galloprovincialis* et l'éponge *Suberites domuncula*. Pour évaluer l'effet du TBT et des HAPs sur l'éponge et la moule, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation des MAP kinases et à l'apoptose.

### **1. Voies de signalisation des MAP kinases et apoptose**

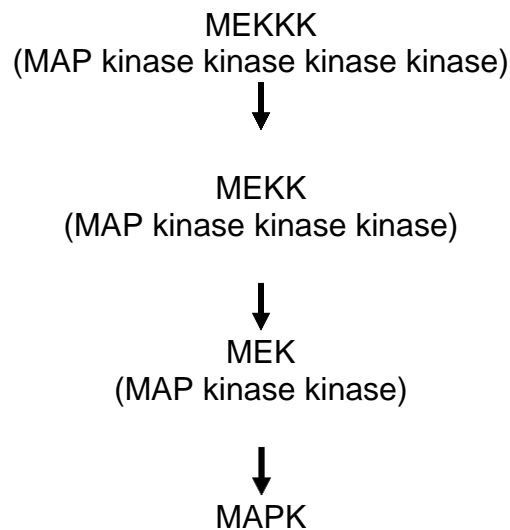
Des études récentes suggèrent que les voies de transduction du signal, qui sont communes à de nombreux types cellulaires et espèces, représentent de multiples cibles pour les polluants marins. Ces voies de communication sont susceptibles de fournir des informations permettant, non seulement de comprendre les effets des polluants sur les organismes marins, mais également de prédire les réponses à des mélanges complexes de contaminants (Burnett, 1997).

La signalisation cellulaire est un terrain d'étude prometteur puisqu'elle représente l'ensemble des mécanismes permettant la transduction de stimuli extracellulaires aboutissant à une réponse cellulaire. L'étude de cette voie renseigne donc sur des perturbations de l'organisme à des stades précoces. Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi d'étudier, en tant que biomarqueur de pollution, la voie des MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases et l'une des réponses cellulaires à un signal, l'apoptose, sachant que les protéines de cette voie sont très conservées entre les espèces, qu'elles sont induites par une grande variété de signaux, et que l'apoptose est un mécanisme largement conservé au cours de l'évolution.

## 1.1. Bilan des connaissances chez les Mammifères

### 1.1.1. Voies des MAP kinases

Les MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases font partie de la superfamille des protéines kinases (Rossomando et al., 1989 ; Boulton et al., 1991). Ce sont des protéines ubiquitaires et d'importants médiateurs impliqués dans la transduction des signaux extracellulaires de la membrane plasmique au noyau. D'une manière générale, une MEKKK (MAP kinase kinase kinase kinase) phosphoryle une MEKK (MAP kinase kinase kinase), kinase pour une MEK (MAP kinase kinase) qui elle-même phosphoryle une MAPK (MAP kinase).

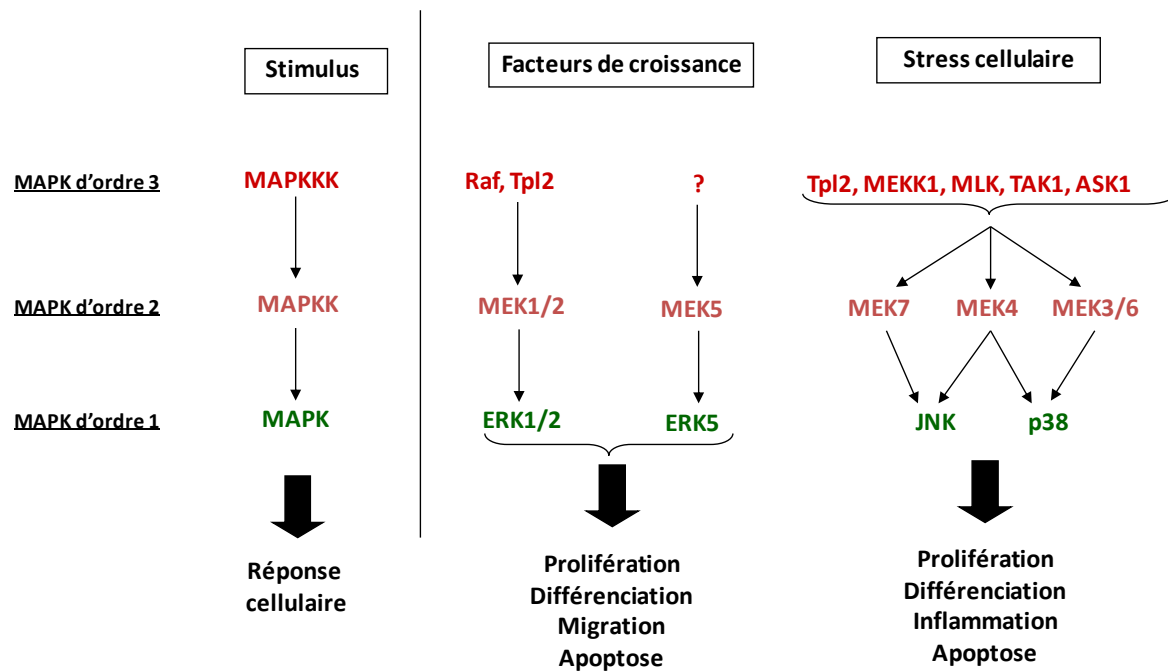


Les MAP kinases sont activées par divers types de signaux, parmi lesquels des mitogènes, des cytokines, les antigènes des lymphocytes T, des phéromones, des esters de phorbol ou encore les UV (A, B, C), des radiations ionisantes, un stress osmotique, un choc thermique, un stress oxydant ; elles initient une variété de réponses cellulaires.

Une caractéristique de toutes les MAP kinases est leur activation par **double phosphorylation** au niveau des résidus Tyrosine et Thréonine présents dans un **motif consensus Thr-X-Tyr** (X = Glu, Gly ou Pro). De la même manière, elles ont une activité kinase « proline dirigée » puisqu'elles phosphorylent seulement des substrats ayant un résidu proline (Kultz, 2001).

Les MAP kinases sont finement régulées par des phosphatases qui, par déphosphorylation d'un seul résidu, les inactivent. En réponse à des stimuli extérieurs, elles régulent l'activité transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription *via* des phosphorylations sur des sites

régulateurs activateurs ou inhibiteurs, et permettent ainsi l'expression d'une grande variété de gènes. La modulation de l'expression génique et la phosphorylation des cibles nucléaires et cytosoliques par les MAP kinases, déterminent les réponses cellulaires aux divers stimuli. Toutes les cellules eucaryotes possèdent de multiples voies des MAPKs qui régulent de façon coordonnée diverses activités cellulaires : la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la survie et l'apoptose (Roux et Blénis, 2004) (Fig. 1).



**Fig. 1. Voies des MAP kinases chez les Mammifères (d'après Dhillon et al., 2007)**

Chez les Mammifères, 4 familles de MAP kinases ont été caractérisées, activées selon la nature du stimulus et déclenchant une réponse cellulaire donnée :

- extracellular signal-regulated protein kinases (ERK) 1 et 2 (ERK 1/2)
- p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$
- c-Jun amino-terminal kinases (JNK) 1,2 et 3
- ERK5

## La voie ERK1/2

La cascade des MAP kinases impliquant ERK1 et 2 a fait l'objet de nombreuses études et est aujourd'hui bien caractérisée. ERK1 et 2 ont 83% d'acides aminés identiques et sont exprimées dans tous les tissus (Chen et al., 2001).

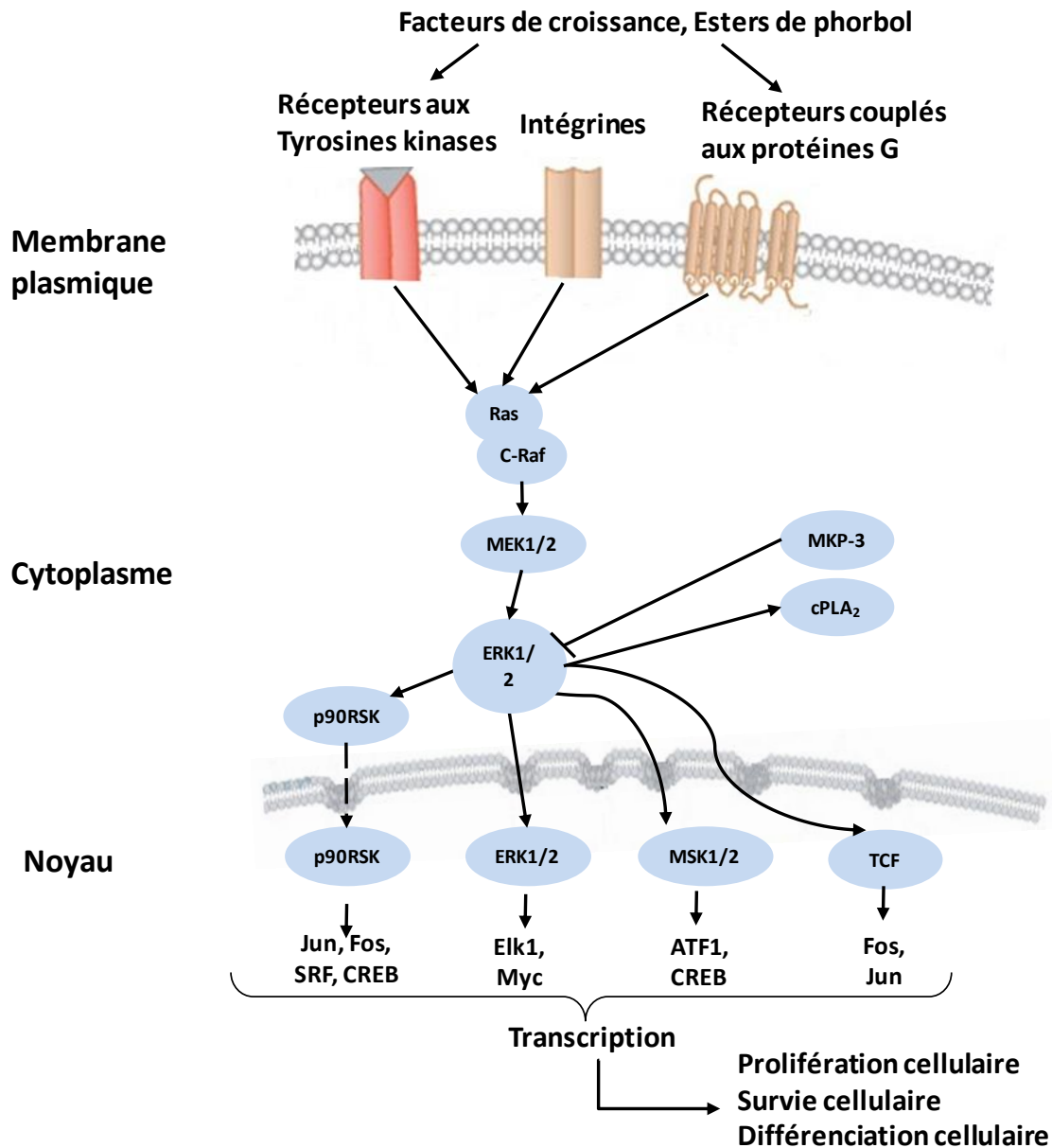
Elles sont très fortement activées par des facteurs de croissance tels que l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet derived growth factor) et le FGF (fibroblast growth factor), par les esters de phorbol, qui, par l'intermédiaire des récepteurs membranaires, tels que les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou couplés aux protéines G, transmettent des signaux activateurs à la cascade Raf/MEK/ERK *via* différentes isoformes de la protéine Ras (Campbell et al., 1998 ; Wood et al., 1992).

Les MEK1/2 activent sélectivement les MAP kinases ERK 1/2 par phosphorylation au niveau d'un motif conservé **TEY (Thr-Glu-Tyr)** présent dans la boucle d'activation, selon un mécanisme distributif (Seger et al., 1992). L'amplification du signal est telle que seulement 5% de recrutement des protéines Ras est nécessaire pour activer la totalité des ERK 1/2 (Hallberg et al., 1994). La phosphorylation des MAP kinases par MEK est amplifiée par MEF (MEK-enhancing factor), qui interagirait avec les MAP kinases et modifierait leur conformation (Scott et al., 1995).

La majorité des protéines ERK 1/2 subit une « translocation » vers le noyau suite à leur activation (Chen et al., 2001 ; Gonzalez et al., 1993 ; Lenormand, 1995).

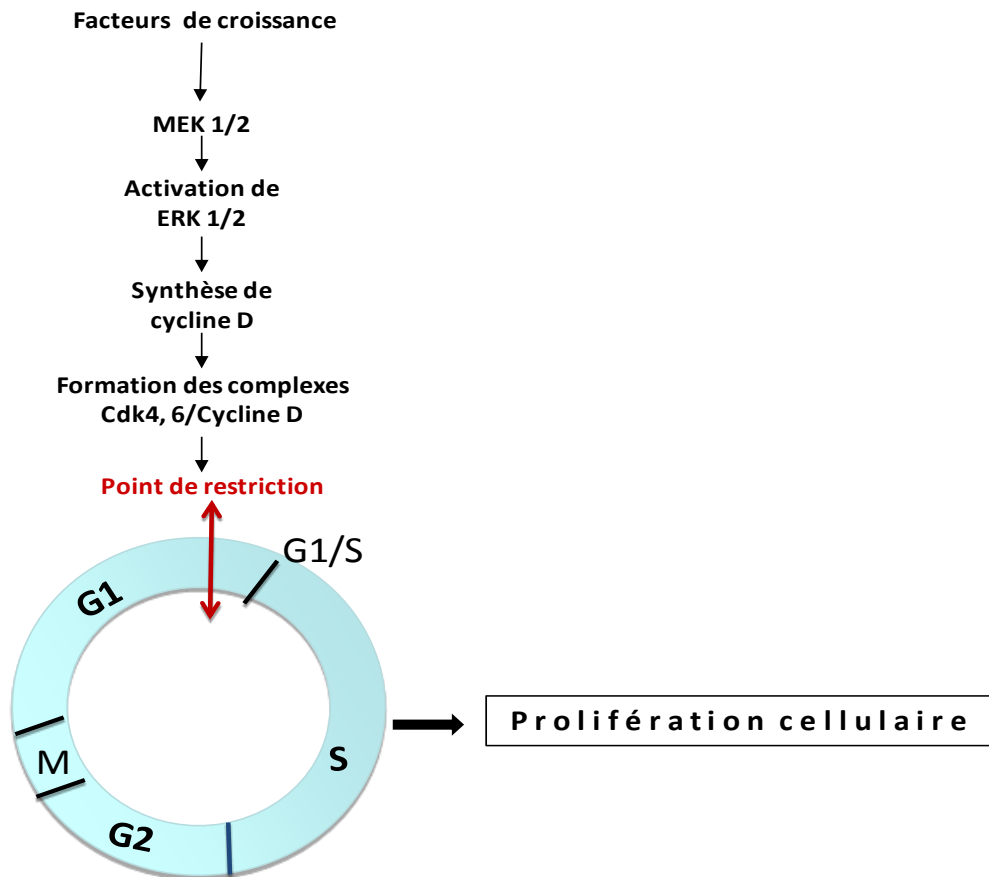
ERK 1 et 2 activent de nombreux substrats, incluant des protéines membranaires, des substrats nucléaires, des substrats cytosoliques comme les protéines du cytosquelette et d'autres protéines kinases (Kyriakis et Avruch, 2001). ERK 1 et 2 initient la transcription des substrats nucléaires tels que Jun, Fos, SRF, CREB, Elk1, Myc, ATF1, directement ou indirectement, *via* la phosphorylation de RSKs (Ribosomal protein S6 Kinases), de MSKs (Mitogen-, Stress- activated protein Kinases) et de TCF (Ternary Complex Factor) (Fig. 2).





**Fig. 2. Représentation schématique de la cascade MEK/ERK précisant certains de leurs substrats (d'après Kyriakis et Avruch, 2001 ; Kultz, 2001 ; Roux et Blenis, 2004).**

Les protéines ERK1/2 ont principalement un rôle dans la **prolifération** cellulaire puisque leur activation est nécessaire au franchissement du point de restriction en G1 et à la progression en phase S (Talarmin et al., 1999) (Fig. 3).

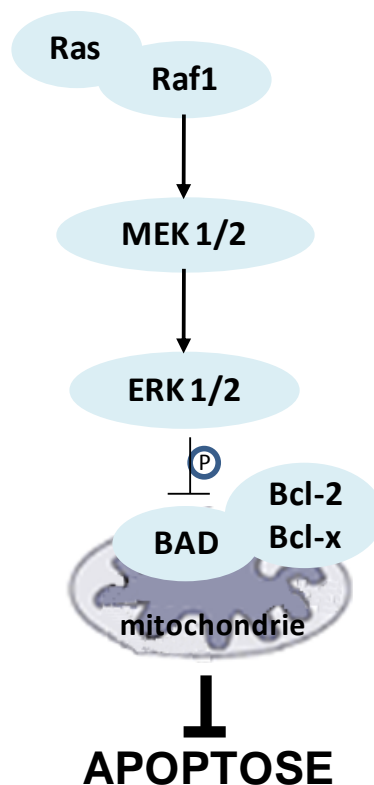


**Fig. 3. Rôle de ERK dans le contrôle du cycle cellulaire (d'après Weber et al., 1997)**

Les cyclines de type D, sous-unités régulatrices des CDK4 et CDK6 (kinase cycline-dépendantes), contrôlent les étapes précoces de la transition G1/S. L'expression de mutants constitutivement actifs de MEK ou de Raf induit l'expression de la cycline D1 (Lavoie et al., 1996). Bien que la voie de ERK soit impliquée dans l'induction de l'expression de la cycline D1 médiée par des facteurs de croissance, dans un grand nombre de modèles biologiques, l'activation de la voie PI3K est aussi concernée puisque l'activation de ERK par MEK ne conduit à l'expression de la cycline D1 que lorsque la PI3 kinase est activée (Treinies et al., 1999). De plus, des travaux de Wright et al. (1999) montrent que MEK1 intervient « négativement » sur la phase G1 vers G2 du cycle cellulaire dans les cellules NIH3T3 ; en effet, une expression ectopique de la forme dominante-négative de MEK1 empêche la progression des cellules dans le cycle cellulaire. D'autre part, le traitement des cellules avec un inhibiteur de MEK1 durant la phase S inhibe la progression des cellules en G2.

En outre, dans la plupart des cellules, la voie ERK semble jouer un effet **anti-apoptotique**. La réduction de son activité est essentielle dans la progression vers l'apoptose. Les travaux de

Xia et al. (1995) montrent en effet, par exemple, que lorsque les cellules PC12 sont cultivées en milieu déplété en sérum, la cascade ERK est inhibée et corrélativement le nombre de cellules apoptotiques augmente. De plus, il a été montré que l'activation de la voie ERK protégeait les fibroblastes NIH3T3 de la mort cellulaire induite par la doxorubicine (von Gise et al., 2001). La prévention de l'apoptose par la cascade ERK peut être activée par Raf1 impliqué directement dans la phosphorylation du facteur pro-apoptotique Bad, empêchant ainsi son interaction avec Bcl-2 et par conséquent l'apoptose. Cette protection de l'apoptose induite par Raf implique l'activation de MEK, ERK1/2 et RSK (Blagosklonny et al., 1997) (Fig.4).



**Fig. 4. Rôle anti-apoptotique de la cascade Ras/MEK/ERK chez les Mammifères**  
(d'après Blagosklonny et al., 1997)

En revanche, dans de rares modèles, il a été montré que la voie ERK était impliquée dans l'induction de l'apoptose. Tel est le cas dans des astrocytes, lors de la synthèse *de novo* de céramides (Blazquez et al., 2000) et après une exposition au taxol (Bacus et al., 2001).

## La voie p38

La protéine p38 fait partie de la famille des SAP (Stress Activated Protein) kinases, activées par un stress. Aussi connue sous les noms de CSBP (Cytokine synthesis anti-inflammatory drug binding protein), HOG1 (High Osmolarity Glycerol Responsive 1), RK (Reactivating Kinase) et SAPK2, p38 a été identifiée pour la première fois dans les cellules de Mammifères.

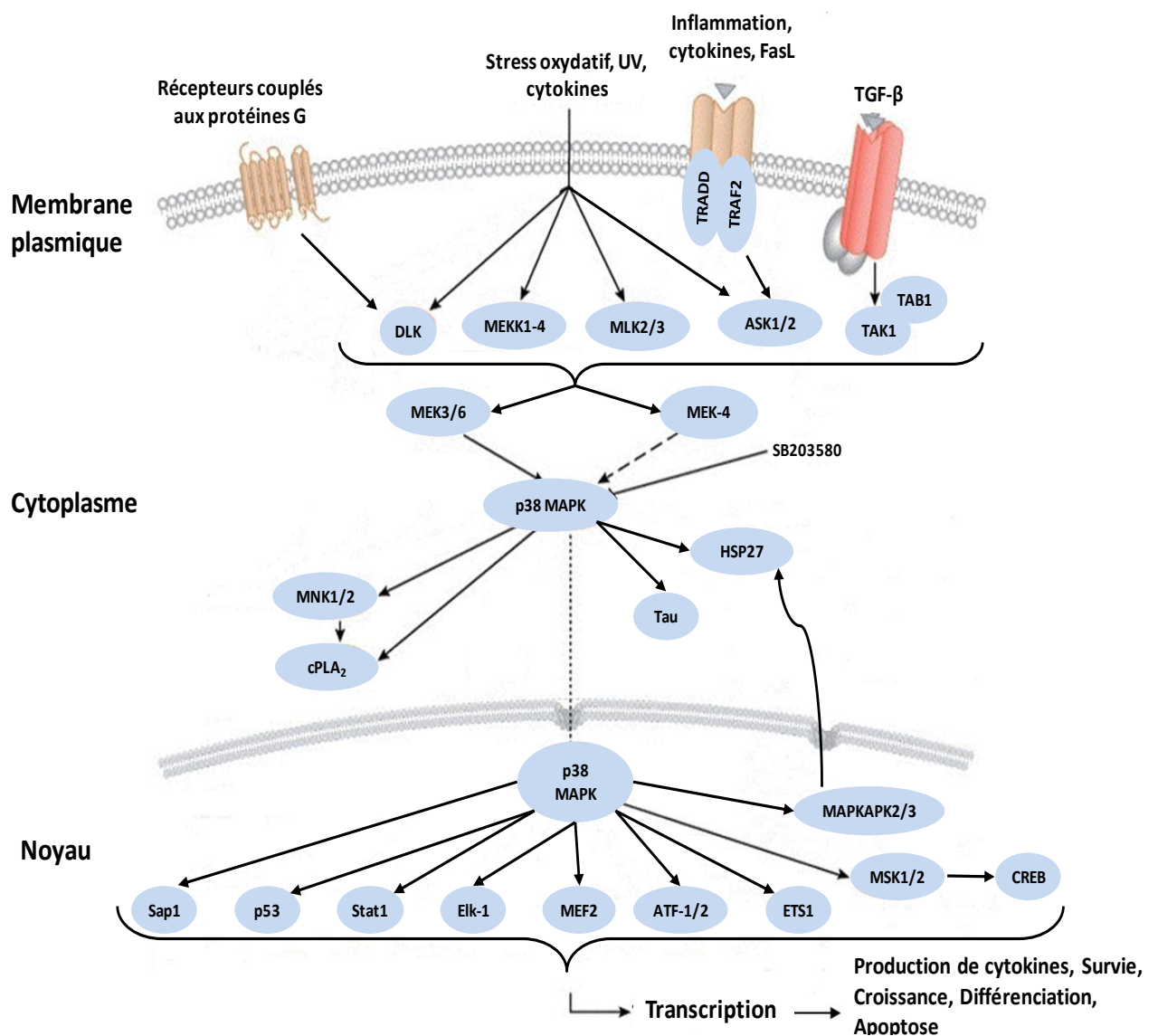
Plusieurs isoformes sont connues : p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . 50% d'acides aminés de p38  $\alpha$  sont identiques à ceux de ERK2. P38 est un homologue de HOG1 chez la levure. Elle est activée en réponse à un choc hyperosmotique (Whitmarsh et Davis, 1996).

Dans les cellules de Mammifères, l'activation des isoformes de p38 a été observée par Chen et al. (2001) en réponse à de nombreux stress physiques et chimiques (stress oxydant, UV, hypoxie, ischémie, nombreuses cytokines, comme IL1 et TNF  $\alpha$ ).

MEK 3 et 6 sont très spécifiques de p38, puisque ces protéines n'activent ni ERK 1/2 ni JNK. MEK4, une JNK kinase, a également la capacité d'activer p38 *in vitro*. Alors que MEK6 peut activer toutes les isoformes de p38, MEK3 phosphoryle préférentiellement les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  de p38 (Robinson et Cobb, 1997).

L'activation de la p38 résulte de la phosphorylation du motif conservé **Thr-Gly-Tyr (TGY)** présent au niveau de la boucle d'activation (Raingeaud et al., 1995 ; Whitmarsh and Davis, 1996), ce qui entraîne la translocation de la protéine dans le noyau.

De nombreuses protéines sont les cibles cellulaires de la p38, notamment la phospholipase A2 cytosolique *via* la MNK1/2, la protéine Tau associée aux microtubules, et les facteurs de transcription ATF1 et 2, MEF2A, Sap1, Elk1, ETS1, STAT1, p53 et CREB *via* RSK (Kramer et al., 1996 ; Kyriakis, 2000). Elle peut également phosphoryler et activer les MAPKAPK 2 et 3 (MAPK-activated protein kinase) qui elles-mêmes phosphorylent les protéines de choc thermique de faible poids moléculaire comme l'HSP 27 induite par le stress (Rouse et al., 1994) (Fig. 5).



**Fig. 5. Représentation de la cascade de signalisation de p38 (d'après Kyriakis et Avruch, 2001 ; Kultz et Avila, 2001 ; Roux et Blenis, 2004).**

Les rôles de p38 chez les Mammifères ont pu être identifiés grâce à l'utilisation de l'inhibiteur SB203580 (Lee et al., 1994).

L'activation de la voie p38 joue un rôle essentiel dans la **synthèse de cytokines pro-inflammatoires** (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL6) (Guan et al., 1998), dans l'induction d'enzymes telles que COX-2 qui contrôle le remodelage du tissu conjonctif dans certaines pathologies (Badger et al., 1998), dans l'expression d'enzymes intracellulaires comme iNOS, régulateur de l'oxydation (Da Silva et al., 1997; Craxton et al., 1998), et d'autres molécules de l'inflammation (Pietersma et al., 1997).

L'implication de p38 dans l'**apoptose** est bien connue ; elle dépend du type cellulaire et du stimulus (Xia et al., 1995; Henkart, 1996 ; Fernandes-Alnemri et al., 1996; Cahil et al., 1996). La surexpression de MEK6, activateur de p38 peut induire l'activation des caspases et conduire à la mort cellulaire (Cardone et al., 1997; Ziegler-Heitbrock et al., 1992 a et b).

Si p38 intervient dans l'apoptose chez certains types cellulaires, son implication dans la **survie, la croissance et la différenciation cellulaire** a également été démontrée à la fois chez la levure et dans des cellules mammaliennes (Takenaka et al., 1998). Chez la levure, l'activation de p38 conduit à une réduction nette de la prolifération. Ce même résultat est obtenu dans des cellules mammaliennes en culture en inhibant la p38 par addition de l'inhibiteur SB203580.

De nombreuses études ont montré l'implication de p38 dans les phases G1 et G2/M du cycle cellulaire (Yee et al., 2004; Molnar et al., 1997; Wang et al., 2000). C'est ainsi que l'arrêt en phase G1 des cellules NIH3T3 provoqué par la microinjection de Cdc42 (cell division control protein 42), protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, a été démontré comme étant dépendant de p38 (Wang et al., 2000). L'effet inhibiteur de p38 sur l'expression de la cycline D1 a également été noté dans des fibroblastes de poumon (Lavoie et al., 1996).

### **La voie JNK**

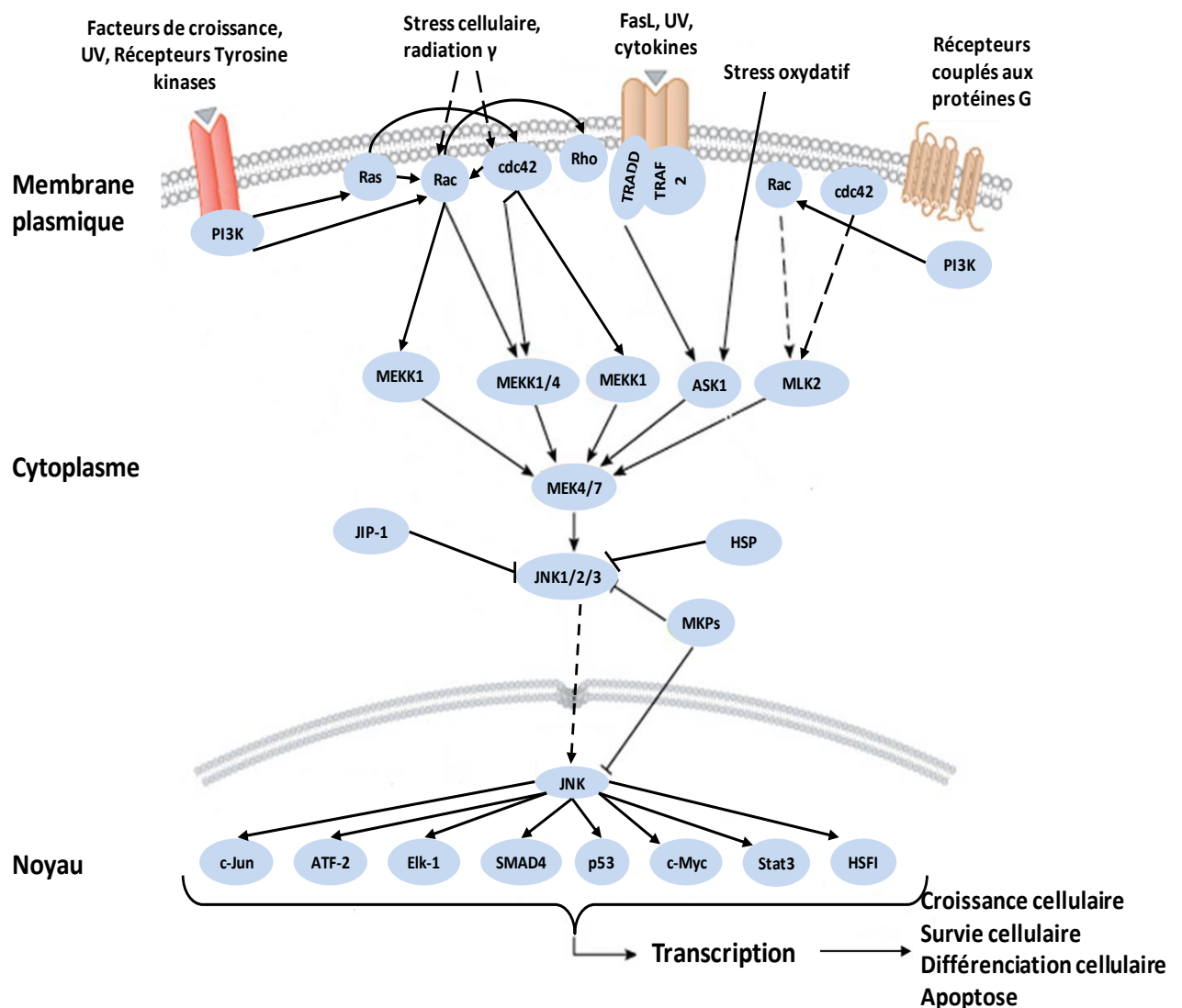
Comme la p38, les protéines JNK font partie de la famille des SAPK. JNK 1 (SAPK $\gamma$ ), 2 (SAPK $\alpha$ ), 3 (SAPK $\beta$ ) sont exprimées de façon ubiquitaire chez les Mammifères, bien que JNK3 semble être localisée au niveau du cerveau. Leur activation étant étroitement associée à la phosphorylation du domaine NH<sub>2</sub>-terminal du protooncogène c-jun, elles ont été appelées JNK (c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases).

Les JNK sont fortement activées par des cytokines, les radiations UV, la privation en facteurs de croissance, les agents provoquant des dommages de l'ADN, et plus faiblement, par quelques récepteurs de protéines G, par le sérum, et les facteurs de croissance (Kyriakis et Avruch, 2001).

Comme pour les autres MAP kinases, l'activation de JNK requiert une double phosphorylation des résidus Tyrosine et Thréonine au niveau d'un motif conservé **Thr-Pro-Tyr** (Davis et al., 1994). Les MAPKK qui catalysent cette réaction sont MEK4 et 7, elles-mêmes phosphorylées et activées par plusieurs MAPKKKs (incluant MEKK1-4, MLK2 et 3, ASK1 et 2) (Kyriakis et Avruch, 2001).

Dans les cellules « non stressées », l'activité kinase de JNK est inhibée par la protéine JIP-1 (JNK interacting protein 1) qui se lie sélectivement à JNK et entraîne sa rétention au niveau du cytoplasme, empêchant ainsi l'expression des gènes induite par cette voie de signalisation (Fuchs et al., 1998). Comme ERK 1/2 et p38, les JNK subissent une translocation du cytoplasme jusqu'au noyau après stimulation (Mizukami et Yoshida, 1997).

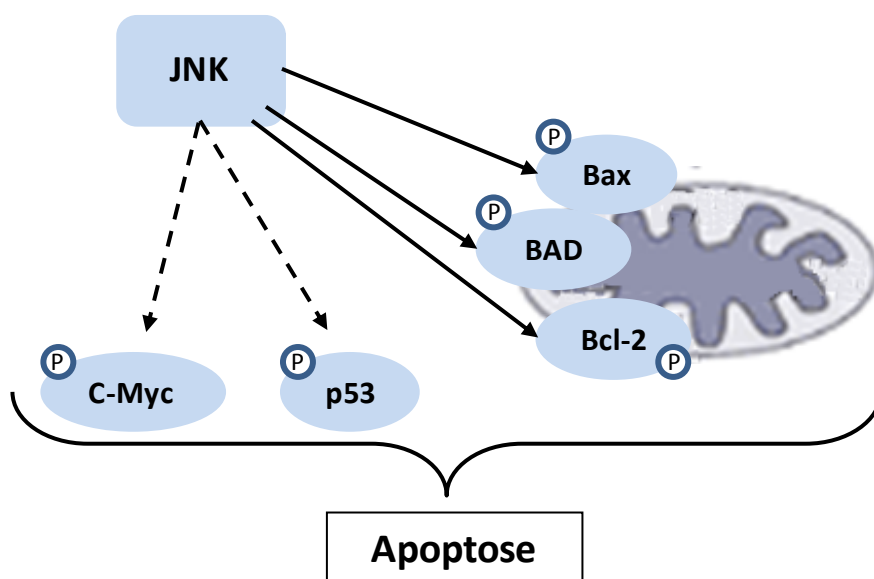
La phosphorylation de c-Jun sur les résidus Ser63 et Ser73 par JNK entraîne une augmentation de la transcription de gènes dépendants de c-Jun (Weston et Davis, 2002), ainsi que de ATF2, STAT3, Elk1, SMAD4, p53, HSF1 (Davis et al., 2000) (Fig. 6).



**Fig. 6. Représentation de la cascade de signalisation de JNK (d'après Kyriakis et Avruch, 2001 ; Davis et al., 1994)**

JNK est un médiateur de l'**apoptose** induite par le stress. Différents types de facteurs induisent l'activation de JNK, incluant un choc thermique, l'inhibition de la synthèse protéique, des anomalies de repliement des protéines, les UV, des dommages de l'ADN et les radicaux libres (ROS) (Zhang et al., 2002a ; Royuela et al., 2002 ; Kuwabara et al., 2003; Hung et al., 2003; Merienne et al., 2003; Sordet et al., 2003).

JNK est capable d'induire l'apoptose par phosphorylation du facteur de transcription p53 (Buschmann et al., 2001; Cheng et al., 2003), après translocation dans la mitochondrie, par phosphorylation (et activation) de protéines pro-apoptotiques comme Bax (Bcl-2 associated protein X) (Mandal et al., 2001), et Bad (Bcl-2 associated death promoter) (Donovan et al., 2002) ou par phosphorylation (et inactivation) de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Mizukami, 1997; Kharbanda et al., 2000 ; Deng et al., 2001; Ito et al., 2001). Un des substrats de JNK, c-myc, peut également être impliqué dans l'induction de l'apoptose (Noguchi et al., 1999; Pelengaris et al., 2000) (Fig. 7).



**Fig. 7. Schéma simplifié des différentes voies de l'apoptose médiées par JNK (d'après Cheng et al., 2003 ; Mandal et al., 2001)**

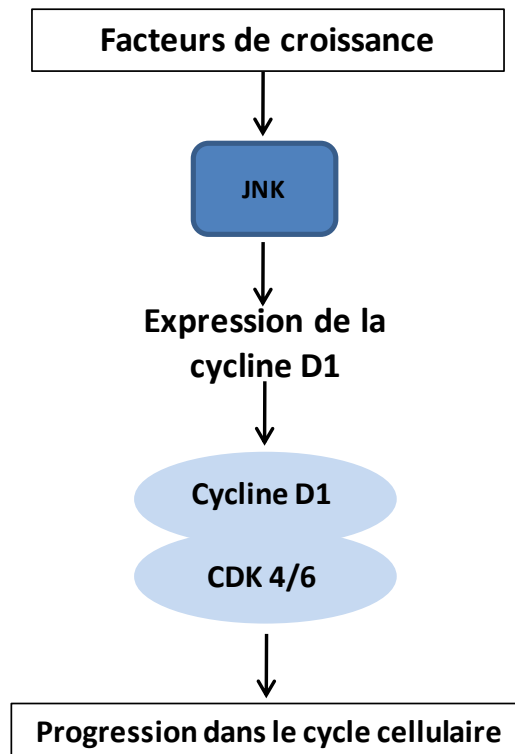
Par ailleurs, les HSP, induites après un choc thermique, inhibent JNK (Volloch et al., 2000). En réponse à une exposition aux UV, le clivage de la protéine BRCA1 (breast cancer tumor suppressor) par la caspase 3, médiée par JNK, induit l'apoptose (Zhan et al., 2002).

En outre, JNK a pour cible un certain nombre d'acteurs du **cycle cellulaire**. Dans plusieurs types cellulaires, cette protéine est activée par des facteurs de croissance. Bost et al. (1997)



ont mis en évidence le rôle essentiel de la voie JNK dans la prolifération cellulaire à partir de cellules de carcinome de poumon humain stimulées par l'EGF.

Schwabe et al. (2003) ont montré que JNK activait le facteur de transcription c-Jun, qui induit l'expression de la cycline D1, déclenchant l'activation des antigènes nucléaires de prolifération cellulaire (PCNA) et des protéines kinases dépendantes des cyclines (cdk) 4 et 6 (Schwabe et al., 2003 ; Yang et Burnstein, 2003), provoquant *in fine* une réplication de l'ADN et la division cellulaire (Fig. 8).



**Fig. 8. Rôle de JNK dans le contrôle du cycle cellulaire (d'après Schwabe et al., 2003 ; Yang et Burnstein, 2003).**

De plus, JNK est connu pour induire l'activité de la télomérase, entraînant ainsi l'immortalisation des cellules (Alfonso-De Matte et al., 2002).

### **1.1.2. Apoptose**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée (MCP) (Lockshin et Beaulaton, 1974 a,b,c) est un processus de mort physiologique. Elle se différencie de la nécrose, processus dégénératif qui intervient dans des cellules ayant subi des dommages physiques, chimiques ou osmotiques.

L'apoptose implique une séquence précise d'évènements cellulaires, décrits en 1972 par Kerr et al. (tissus humains et murins). Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui induit la destruction d'une cellule, tout en préservant l'intégrité cellulaire

environnante. Elle survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Cependant, elle peut également se produire en conditions pathologiques et de stress intense de l'organisme.

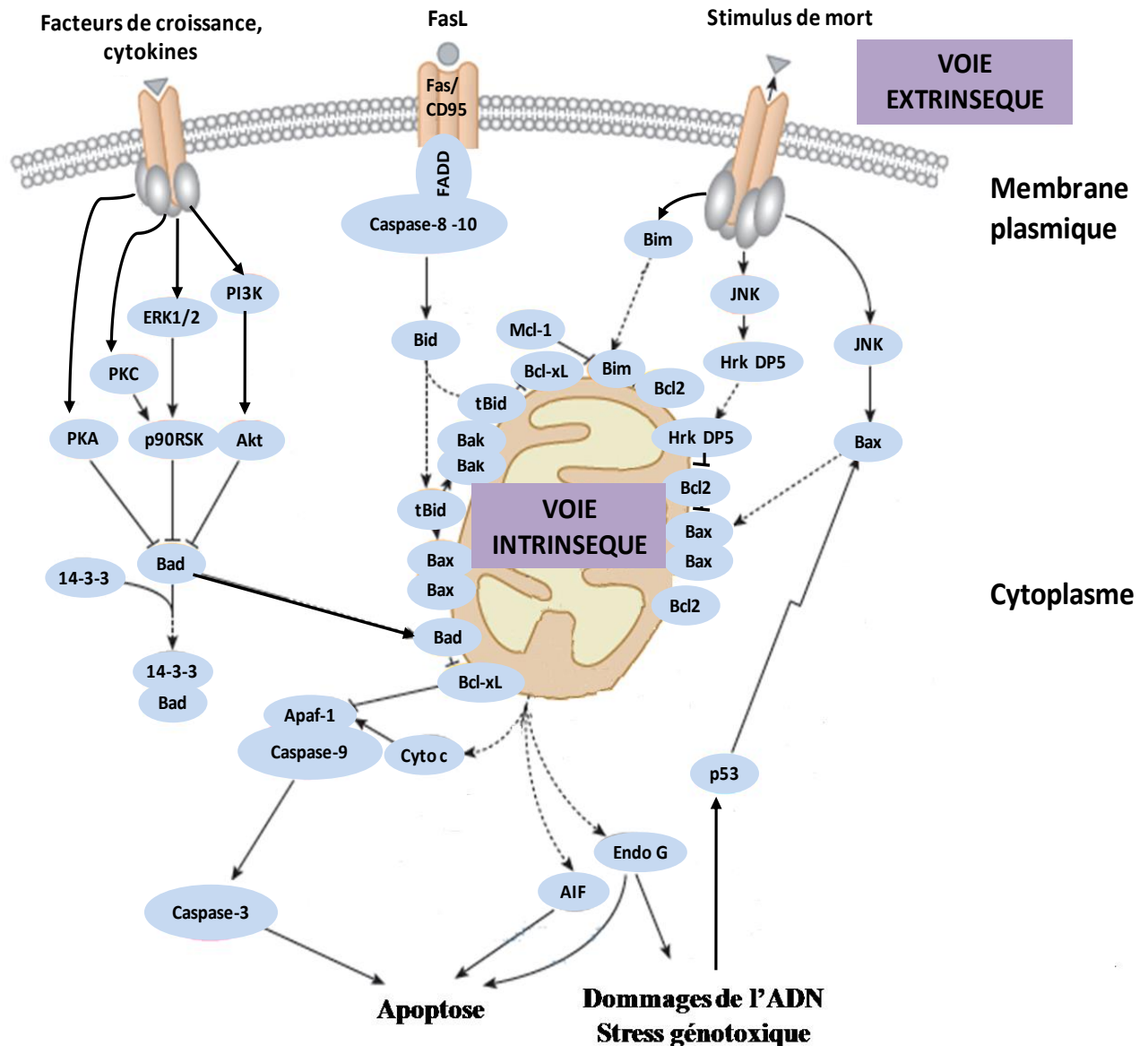
L'apoptose est caractérisée par des modifications (Kerr et al., 1972) :

- **morphologiques** : diminution du volume cellulaire, avec maintien de l'intégrité structurale de la membrane plasmique, relocalisation des organites cytoplasmiques, condensation de la chromatine puis fragmentation du noyau et de la cellule en corps apoptotiques,
- **biochimiques** : externalisation de la phosphatidylsérine, chute du potentiel de membrane au niveau des mitochondries, activation des caspases et dégradation de l'ADN en fragments oligonucléosomiaux.

Il existe deux voies de signalisation aboutissant à l'apoptose :

- la voie des récepteurs de mort ou **voie extrinsèque**,
- la voie mitochondriale ou **voie intrinsèque**.

Ces deux voies conduisent à l'activation de molécules effectrices de l'apoptose, les caspases (Fig. 9).



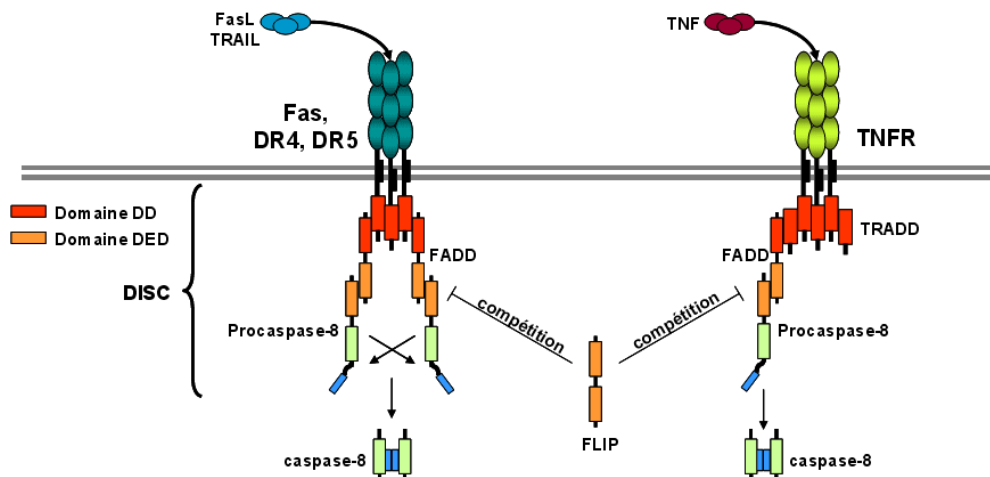
**Fig. 9. Schéma général de l'apoptose (d'après Mignotte et Vayssiere, 1998 ; Gupta, 2003)**

### Les récepteurs de mort

Ils appartiennent à la superfamille du récepteur  $\text{TNF}\alpha$  (TNFR) ; 7 membres forment le sous groupe des récepteurs de mort (DR : Death Receptor) : Fas (CD95/APO-1; ligand: FasL), TNFR1 (p55/CD120a; ligands :  $\text{TNF}\alpha$  et  $\beta$ ), DR3 (ligand: VEGI), DR6, p75NGFR (récepteur au facteur de croissance neuronale ; ligand: NGF) et les 2 récepteurs TRAIL : DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2).

Les récepteurs sont composés d'un nombre variable de domaines riches en cystéine (DRC), dans leur partie extracellulaire. Les DRC permettent la stabilité des structures trimériques des

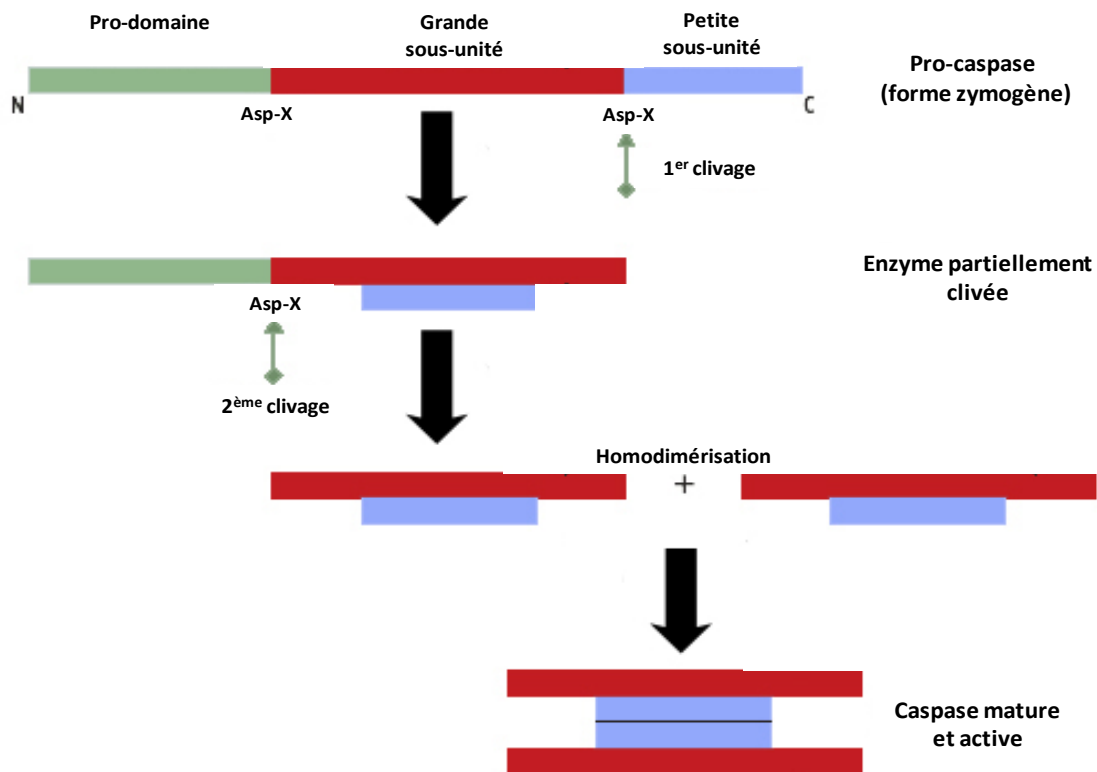
récepteurs. Seuls quelques-uns des TNFR possèdent le domaine de mort intracellulaire (DD : Death domain). La fixation du TNF sur son récepteur conduit à sa trimérisation (Ashkenazi, 2002), ce qui permet à TRADD (TNFR-associated death domain), molécule adaptatrice, de se fixer par interaction entre les domaines de mort (DD). TRADD s'associe ensuite à FADD (Fas-associated Death Domain), ce qui induit l'apoptose *via* l'activation de la caspase 8 (Fig. 10).



**Fig. 10. Structure de récepteurs de mort, DD : Death Domain ; DED : Death Effector Domain ; FADD : (d'après Gupta, 2003)**

## Les caspases

Les caspases, protéases à cystéine, clivent leurs substrats après un acide aspartique, d'où leur nom générique de Cysteine Aspartate Proteases (Alnemri et al., 1996). Elles ont une structure très conservée et sont synthétisées sous forme de zymogène ou pro-caspase. Ces pro-caspases contiennent un pro-domaine N-terminal de taille variable et un domaine catalytique C-terminal, constitué de deux sous-unités de 20 et 10 KDa. Les caspases à pro-domaine long (caspase 8, 9 et 10) sont appelées caspases initiatrices ; elles clivent et activent les caspases effectrices. Les caspases à pro-domaine court (caspases 3, 6 et 7) clivent différents substrats comme PARP (PolyADP Ribose Polymerase), enzyme de réparation cellulaire, ou la lamine A. (Fig. 11).



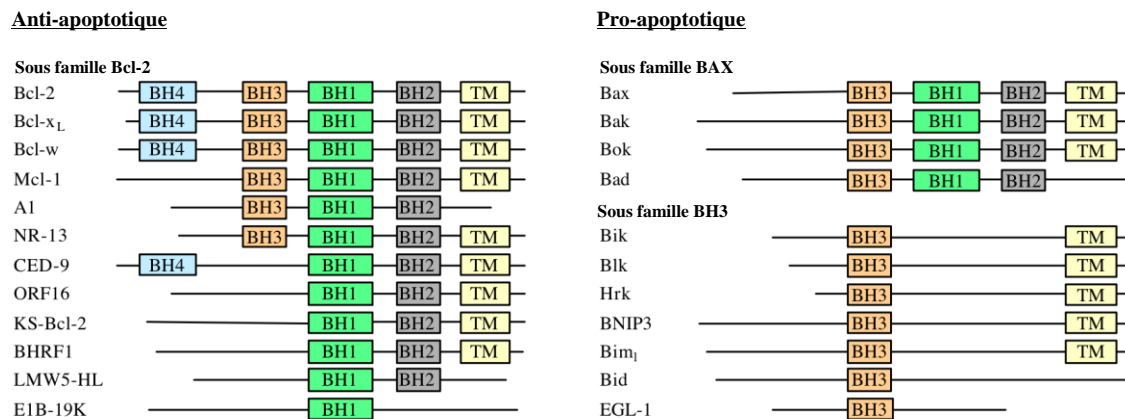
**Fig. 11. Activation des caspases (d'après Couzinet et al., 2002)**

### **Bcl-2 et cytochrome c**

La famille Bcl-2 peut être divisée en deux sous familles : les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-10) et les protéines pro-apoptotiques (Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim, Bax, Bak, BLK, Bmf, Hrk/DP5, Bcl-xS) (Fig. 12). Tous les membres de cette famille possèdent l'un des 4 motifs conservés au cours de l'évolution, BH1 à BH4 (Bcl2 Homology Domain), indispensables pour les interactions protéiques. Seules les protéines anti-apoptotiques possèdent les 4 domaines BH.

La balance entre le taux des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques conditionne l'entrée en apoptose d'une cellule. Bcl-2 et Bcl-xL inhibent l'apoptose en se liant aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak.

Dans des cellules saines, Bad est phosphorylé et séquestré dans le cytoplasme par une protéine adaptatrice, 14-3-3. Dans les cellules apoptotiques, le taux cytoplasmique de Bad augmente, favorisant la formation de complexes Bcl-2/Bad et Bcl-xL/Bad. Bax et Bak ainsi libérés, s'insèrent dans la membrane mitochondriale où ils créent des pores. Le cytochrome c passe alors dans le cytoplasme où il forme un complexe, appelé apoptosome, constitué de Apaf1 et de la pro-caspase 9, ce qui active la caspase 9.



**Fig. 12. Protéines de la famille de Bcl-2 chez les Mammifères (domaine BH : Homologue de Bcl-2 et domaine TM transmembranaire) (d'après Borner, 2003)**

## 1.2. Etat des connaissances chez l'éponge et la moule

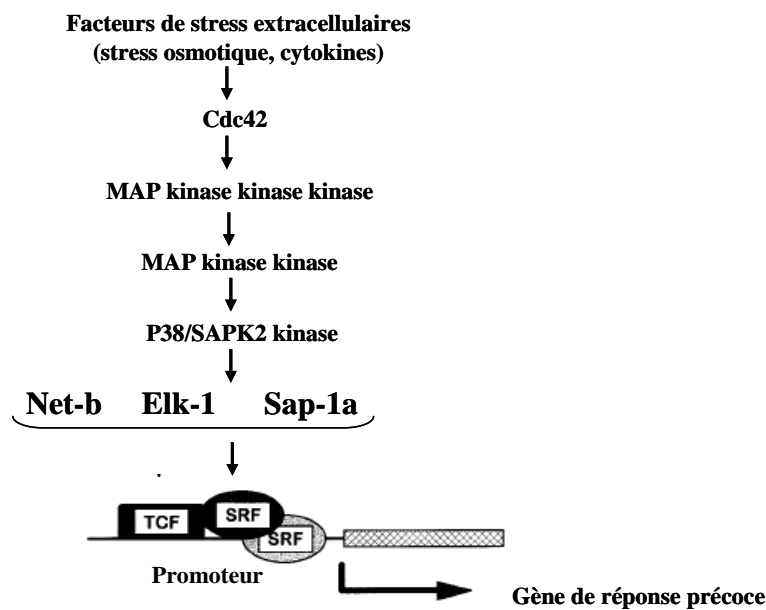
### 1.2.1. Les MAP kinases

#### Chez l'éponge

La cascade de signalisation des MAP kinases a été caractérisée chez les Métazoaires et en particulier chez les éponges (Porifères), organismes multicellulaires. Elle n'est pas été complètement identifiée chez l'éponge *Suberites domuncula*. Cependant, le gène codant pour une protéine kinase Krs (Kinase Responsive Stress) a été isolé (Krs\_SD) (Kruse et al., 1997) présentant une forte homologie avec ceux de la famille des protéines kinases STE20 (Creasy and Chernoff, 1995) qui sont activées en réponse à des phéromones chez la levure (Leberer et al., 1992). Les kinases Krs jouent un rôle dans la réponse au stress (Taylor et al., 1996). Les protéines homologues des Krs, caractérisées chez les Mammifères, agissent en amont de la cascade conduisant à l'activation de p38 (Kyriakis and Avruch, 1996).

Après la mise en évidence chez l'éponge de molécules ayant une forte homologie de séquence avec les cytokines des Mammifères (Müller et al., 1999), l'étude des voies de signalisation des MAP kinases s'est développée. Les gènes codant pour p38 et JNK MAP kinases ont ainsi

été clonés chez *S. domuncula*. Il a été démontré que ces kinases étaient activées en réponse à un choc hyperosmotique et après exposition à des lipopolysaccharides bactériens (Böhm et al., 2000 ; Böhm et al., 2001). P38 phosphoryle les deux composants du TCF (Ternary complex factor), Elk-1 et Sap-1a, qui interagissent avec SRF (Serum-response factor), identifié chez l'éponge par Scheffer et al. (1997). SRF, lié à CArG (Gamulin et al., 1997), active les gènes de réponse précoce, notamment *erg-1*, surexprimé après un stress environnemental (Lim et al., 1998) (Fig. 13).



**Fig. 13. Mécanisme d'activation des gènes de réponse précoce par la voie p38 chez *Suberites domuncula* (d'après Böhm et al., 2000)**

### Chez la moule

Les MAPK et leurs rôles ont été récemment étudiés chez les mollusques bivalves, notamment dans les hémocytes et les cellules de glande digestive de la moule *M. galloprovincialis* (Canesi et al., 2001 ; 2002 a, b, c). Une activation de p38 a été démontrée après une exposition à des bactéries (Canesi et al., 2001 ; 2002 a, b, c; 2005), en réponse à l'hypoxie, à un stress hypoosmotique ou hyperosmotique (Gaitanaki et al., 2003), à des facteurs de croissance (Canesi et al., 2001), à des métaux lourds (cuivre, zinc, cadmium) (Burlando et al., 2006 ; Kefaloyianni et al., 2005), au peroxyde d'hydrogène (Gaitanaki et al., 2004) et à des variations de température (Kefaloyianni et al., 2005). Les gènes codant pour ces protéines n'ont en revanche jamais été séquencés.

Différents contaminants de l'environnement, appelés «Endocrine Disrupting Chemicals» (EDC) (Witorsch, 2002) affectent la fonction des hémocytes de moule, *via* la modulation des voies de signalisation. C'est ainsi que les biphényl polychlorés (BPC) induisent la phosphorylation des MAPKs (Canesi et al. 2003). Il en est de même pour certains oestrogènes synthétiques comme le diethylstilbestrol (Canesi et al., 2004 a et b), le bisphenol A (BPA) et le nonylphenol.

Des travaux chez les bivalves ont permis de corrélérer l'activation des MAPKs et l'induction des HSP. Ainsi, l'étude de Malagoli et al. (2004) a montré une activation de p38-MAPK et des Hsp70/90 après stimulation des moules par un champ électromagnétique. De la même manière, au niveau des branchies de *M. galloprovincialis*, les stimuli qui induisent l'expression des HSP, activent également la voie des MAPKs (Fabbri et al., 2008).

### 1.2.2. L'apoptose

#### Chez l'éponge

Les gènes codant pour les molécules clés de la voie de signalisation conduisant à l'apoptose ont été identifiés chez les éponges. Le gène codant pour le facteur anti-apoptotique Bcl-2 a été isolé chez *Geodia cydonium* et *S. domuncula* (Wiens et al., 2000 ; 2001). Leur exposition au tributylétain ou à un choc thermique, entraîne une augmentation de la transcription du gène codant pour Bcl-2. Ce gène, transfecté dans une lignée cellulaire humaine (HEK-293), protège les cellules de l'apoptose médiée par le TBT ou provoquée par l'absence de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture (Wiens et al., 2001).

L'utilisation d'un inhibiteur de la caspase 3, a permis de démontrer sa présence chez l'éponge *G. cydonium*. De plus, 2 ADNc codant pour la caspase 3 ont été clonés ; ils présentent de fortes homologies avec les sous-unités de la caspase 3 des Mammifères (Wiens et al., 2003). Récemment, ce même gène a été caractérisé chez l'éponge *S. domuncula* ; son expression est induite par un lipopeptide bactérien (Wiens et al., 2007).

Par ailleurs, l'existence de gènes codant pour des domaines de mort (DD : Death Domain) a été mise en évidence. Le gène pro-apoptotique DD2 a aussi été séquencé chez *G. cydonium* ; il présente une forte homologie avec les séquences FADD et Fas humaines (Wiens et al., 2000).



## **Chez la moule**

L'apoptose a déjà été décrite chez des bivalves marins (Sunila et LaBanca, (2003) ; Sokolova et al. (2004) ; Buckland-Nicks et Tompkins (2005)).

Les cellules de mollusque et en particulier les hémocytes, possèdent une enzyme proche de la caspase 3 (Pirger et al., 2008). Elle peut être activée par le cytochrome c (Sokolova et al., 2004) ou par la staurosporine mais il semblerait, par différence avec les Mammifères, que son mécanisme d'activation ne requiert pas un clivage de la pro-caspase 3 (Bravarenko et al., 2006). Une partie de la séquence du gène codant pour la caspase 3 de moule *M. galloprovincialis* a été publiée récemment (accession EF080944).

Le TNF $\alpha$  des Invertébrés et des Vertébrés possède de fortes similitudes au niveau moléculaire et fonctionnel. Terahara et Takahashi (2008) ont montré dans des hémocytes que son expression augmentait en réponse à une infection bactérienne, suite à une induction de l'apoptose.

Un homologue de p53 a également été identifié chez la moule. P53, chez les Mammifères, a une action anti-tumorale par arrêt du cycle cellulaire ou par induction de l'apoptose, en réponse à une exposition à des agents génotoxiques (Böttger et al., 2008).

En outre, un homologue de AIF (Apoptosis Inducing Factor) a été isolé chez l'huître *Crassostrea virginica* (accession MGID89694).

## **2. Animaux et sites de prélèvement**

### **2.1. Espèces cibles**

Pour cette étude, notre choix s'est porté sur l'éponge et la moule, organismes filtreurs pouvant concentrer les contaminants du milieu marin (Goldberg, 1975; Philips, 1977; Phillips et al., 1980; Philips et Segar, 1986) et répondant aux critères de bons « bioindicateurs quantitatifs » tels que définis par Butler, 1971 et Philips et Rainbow (1994), à savoir que l'animal doit :

- concentrer le contaminant, sans effet léthal, aux concentrations rencontrées dans le milieu ;
- être sédentaire afin d'être représentatif de la zone d'échantillonnage ;
- être abondant dans la zone étudiée ;
- avoir une durée de vie suffisamment longue pour permettre l'échantillonnage de plusieurs classes d'âge ;
- avoir une taille suffisante afin de pouvoir disposer d'une quantité de tissus adéquate pour l'analyse chimique ;
- être euryhalin ;
- concentrer suffisamment pour permettre des dosages sans préconcentration.

En outre :

- il doit y avoir une corrélation entre la teneur en contaminants dans l'organisme et la concentration dans l'eau environnante, la concentration dans les tissus reflétant ainsi la biodisponibilité du métal dans le milieu ;
- les effets de variations de la salinité et de la température doivent être connus.

### ***L'éponge marine *Suberites domuncula****

Nous avons utilisé l'éponge *S. domuncula*, collectée en mer adriatique (Croatie) pour étudier en laboratoire l'effet de polluants marins. Même si peu d'études ont été faites en utilisant l'éponge pour des programmes de surveillance de la qualité des eaux, cet organisme répond aux prérequis définis par Butler, 1971 et Philips et Rainbow (1994). Il s'agit en effet d'organismes filtreurs non sélectifs pouvant retenir du matériel particulaire (bactéries, plancton) dont le diamètre n'excède pas 8 µm (Wolfrath et Barthel, 1989). Ils sont également capables de bioaccumuler des particules en suspension. L'ensemble des tissus filtre l'eau et bioaccumule des composés dissous comme des hydrocarbures (Zahn et al., 1981), des composés organochlorés (Perez et al., 2003), des métaux (Carballo et al., 1996, Webster et al., 2002 et Perez et al., 2005)...Ce sont des espèces sessiles vivant pendant plusieurs années au même endroit.

### ***La moule *Mytilus galloprovincialis****

Parmi les bivalves, organismes les plus utilisés dans les programmes de surveillance du milieu marin, la moule est très largement utilisée pour étudier la variabilité spatiale et temporelle de contaminants de l'environnement côtier (Phillips, 1976; Philips, 1977; Phillips et al., 1980; Philips et Segar, 1986; Cossa, 1989; Wolfe, 1991; Regoli et Orlando, 1993; Augier et al., 1994; Ka Imoussi et al., 2001; Kljakovic Gaspic et al., 2002).

Cette espèce présente les caractéristiques expliquant qu'elle soit considérée comme « espèce sentinelle ». Par différence avec l'éponge, sa consommation par l'homme est source de risque sanitaire en cas de bioaccumulation de certains xénobiotiques.

## **2.2. Sites de prélèvement**

Les moules et les éponges destinées aux expérimentations sont prélevées en mer adriatique, sur la côte croate.

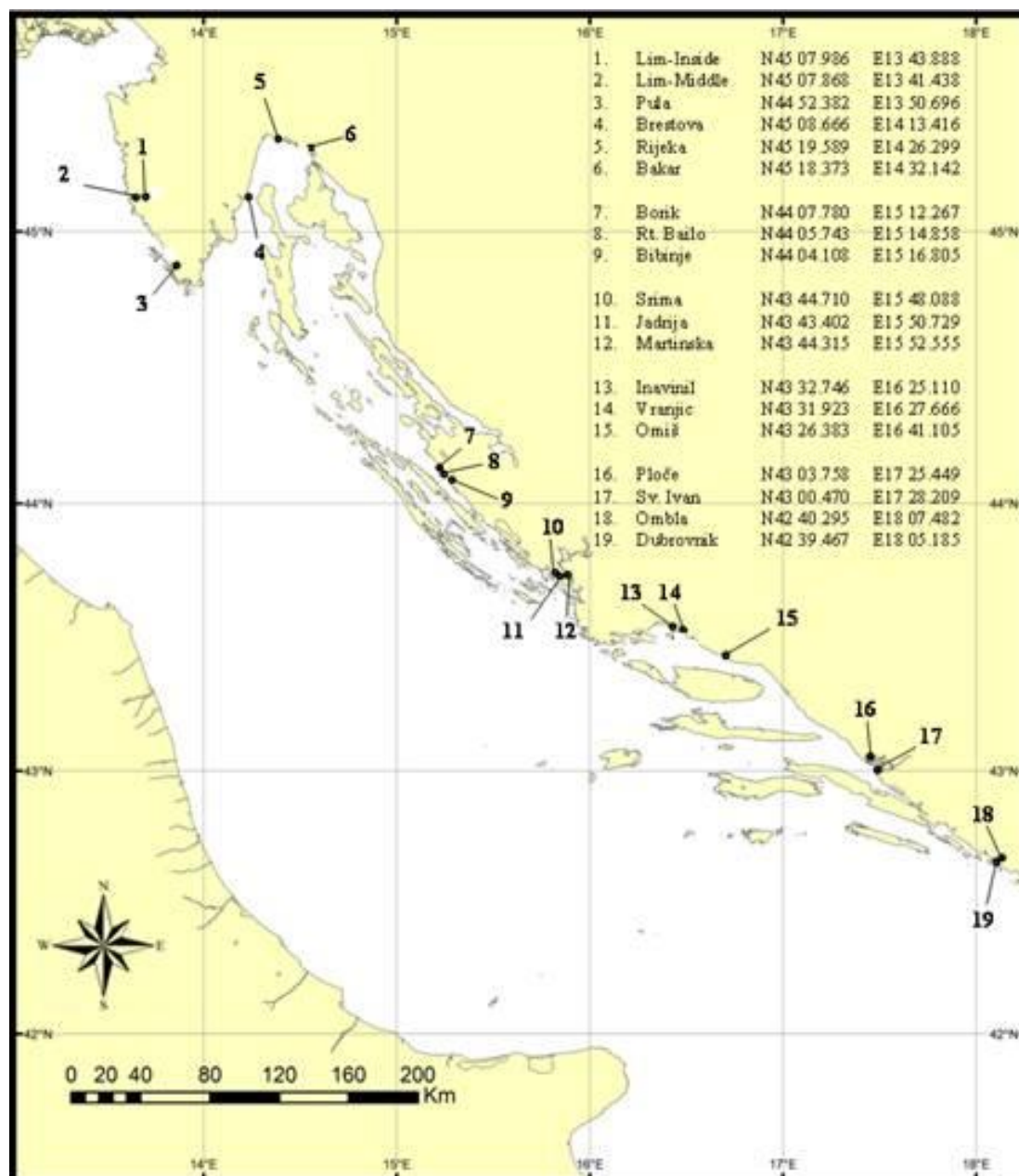
- Pour les expérimentations en laboratoire, les moules sont prélevées à Rovinj. En ce qui concerne les éponges, elles sont réparties du Nord au Sud le long de la côte adriatique et les

premières maricultures ont été mises en place en Istrie (Müller et al., 2004). Les éponges que nous avons utilisées, ont été collectées, dans cette région, près d'Umag (Fig. 14).

- Pour l'approche *in situ*, les moules sont collectées durant l'hiver et l'été 2007, dans 19 stations de la côte adriatique (Fig. 15).



**Fig. 14. Carte représentant la Croatie, bordée par la mer Adriatique et localisant les sites de prélèvement des animaux destinés aux expérimentations en laboratoire**



**Fig. 15. Sites de prélèvement des moules en mer adriatique pour l'approche *in situ***

Le tableau 1 regroupe un certain nombre d'informations concernant l'activité, la température de l'eau, la salinité pour les divers sites d'où proviennent les moules que nous avons analysées.

Site n°	Stations	Activités	Hiver		Eté	
			T°C	Salinité	T°C	Salinité
1	Lim-Inside	parc naturel, mariculture	-	-	25,8	36,9
2	Lim-Middle	parc naturel, mariculture	14,6	36,1	25,4	36,7
3	Pula	zone portuaire, rejets industriels	14,1	29,5	26,1	36,7
4	Brestova	zone de pêche, port	14,4	36,2	23,6	36,9
5	Rijeka	zone portuaire, rejets industriels	10,5	5,8	12,3	6,2
6	Bakar	zone de pêche, port	13,1	11,8	22,8	18,8
7	Borik	loisirs	12,8	36,1	27,0	36,8
8	RI. Bailo	loisirs	12,5	36,2	27,0	37,3
9	Bibinje	-	-	-	26,9	37,2
10	Srima	zone de pêche, port	12,3	23,4	-	-
11	Jadrija	loisirs	12,2	3,6	27,4	28,5
12	Martinska	rivière Krka	13,3	27,4	26,3	36,0
13	Inavinil	rejets industriels	-	-	-	-
14	Vranjic	rejets industriels et eaux usées	-	-	-	-
15	Omîs	zone de pêche, rivière Cetina	13,4	35,3	25,2	36,4
16	Ploce	zone de pêche, rivière Neretva	13,2	11,3	25,6	35,8
17	Sv. Ivan	-	12,2	22,1	22,1	36,5
18	Ombra	rivière Ombla	12,9	8,8	21,2	36,7
19	Dubrovnik	port, rejets d'eaux usées	13,5	10,8	24,6	27,6

**Tableau 1. Activités dans les différents sites de prélèvement des moules destinées aux études *in situ* (Adriatic project 2007).**

La mer Adriatique est une zone semi-close de la Méditerranée, d'où son intérêt pour étudier la présence, la répartition et les effets de polluants sur les poissons, les mollusques et les crustacés. Elle est délimitée par la péninsule italienne à l'Ouest et par la péninsule des Balkans à l'Est. Reliée à la mer Méditerranée par le détroit d'Otranto, elle est longue de 800 kms, pour un volume d'eau estimé à 35000 km<sup>3</sup>.

Les entrées et sorties d'eau se font à un débit de 5700 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> (Sekulic et Vertacnik, 1996). La rivière Po, qui passe en Italie du Nord, le long d'aires hautement peuplées, se jette au Nord Ouest en mer Adriatique, avec un fort débit (1585 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>) (Cati, 1981). Cette arrivée d'eau représente 5 % des eaux entrantes en Méditerranée (Gacic et al., 2001). Les courants sont faibles au niveau de la baie de Rijeka (site n°5). Il s'agit donc d'un système aquatique présentant peu d'échanges de volumes d'eau. D'une manière générale, la circulation en mer adriatique est cyclonique, avec une entrée d'eau « propre » venant de la Méditerranée (Bihari et al., 2005).

L'activité conchylicole est importante sur la côte croate. Aux fermes piscicoles représentant 43 exploitations et 6 éclosiers, s'ajoutent en effet 56 unités d'élevage de coquillages (Dujmušić, 2000). La production aquacole annuelle est estimée à 3000 tonnes de coquillages.

S'y ajoutent 6000 tonnes de carpes et truites, 4000 tonnes de thon et 3000 tonnes de bars. La Croatie a, en particulier, un long passé dans l'élevage de la moule *M. galloprovincialis* et de l'huître plate *Ostrea edulis*, en Baie de Malostonski et de Limski (FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009).

Le tourisme saisonnier, l'activité industrielle en zones urbaines, l'apport de rivières (UNEP/WHO, 1999) sont à l'origine d'une forte pollution de certains sites et notamment : Pula (3), Rijeka (4, 5, 6), Zadar (7, 8, 9), Sibenik (10, 11, 12), Kastela Bay, Split (13, 14, 15) et Dubrovnik (18, 19). La répartition des polluants dans la région côtière croate est fortement influencée par les courants et les vents (Gacic et al., 2001).

Une corrélation entre la zone d'échantillonnage des moules et le niveau d'altération de l'ADN, mesurée par la technique du Fast micromethod<sup>®</sup>, a déjà été établie par Bihari et al. (2005). Ce niveau d'altération tend à diminuer du Nord au Sud. Il est plus important pour les animaux des zones urbaines, au Nord, où les activités industrielles sont développées et où il n'y a pas d'usines de traitement des eaux usées.

En outre, un réseau d'oléoducs est situé dans le comté de Primorsko-Goranska (terminal pétrolier et raffinerie à Omisalj/Rijeka (4, 5, 6) : (JANAF — Plc JAdranski NAFtovod), ce qui sous-entend un transport pétrolier vers des raffineries nationales et de l'Europe centrale et orientale. Bien qu'il ne se soit produit aucune pollution importante à ce jour, liée à la présence des oléoducs, d'éventuelles fuites de pétrole brut constituent un sujet d'inquiétude en Croatie (Rapport AEE n° 4/2006) (Fig. 16).

De plus, un rapport croate de 2004 (institut Ruder Boskovic) a montré un haut taux de degré d'imposex chez l'escargot *Hexaplex trunculus* associé à de forts taux de tributylétain dans les zones portuaires de la côte adriatique nord.



**Fig. 16. Zones de préoccupation environnementale majeure et points de pollution de la côte Est de la mer Adriatique (Croatie) (D'après le rapport AEE n° 4/2006)**

L'industrie touristique représente 30 % du PIB de la Croatie ; la protection de l'environnement constitue donc actuellement une préoccupation majeure de ce pays. Compte tenu de la vulnérabilité écologique de cette mer semi-fermée, les moyens juridiques de prévention et de répression des pollutions marines ont été renforcés en Croatie qui possède 1200 îles et îlots et un littoral s'étendant sur une longueur de 5835 km (74 % du total du littoral adriatique) et où l'activité pétrolière est intense. L'incidence d'un choc pétrolier dans cette mer fermée constituerait une catastrophe écologique durable si l'on considère qu'il faut 120 ans pour que l'eau se renouvelle.

La Croatie applique depuis 2007 les règles de déballastage des rejets d'eau. Elle l'interdit dans les ports si les eaux contiennent des produits nocifs (projet "GloBallast Partnership 2007-2012"). En 2008, des progrès ont été réalisés dans la lutte contre la pollution industrielle et la gestion des risques. Un programme national de contrôle de la qualité de l'eau est en cours d'élaboration. En 2009, le meeting de la commission Croatie-Slovenie-Italie pour la protection de la mer Adriatique et de ses côtes a souligné les progrès concernant la gestion des eaux usées, avec notamment une loi sur le rejet des PCB (biphényles polychlorés) et des PCT (triphényle polychlorés).

### **3. Polluants testés en laboratoire**

Le choix des polluants pour une exposition des animaux en laboratoire tient compte du contexte en mer adriatique, dans le but de corrélérer les résultats à ceux obtenus pour l'approche



*in situ*. Nous avons ainsi décidé de tester l'effet des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs) et du tributylétain (TBT).

Quelques études récentes en mer adriatique montrent le niveau de contamination par les HAPs (Tableau 2) et par le TBT (Tableau 3) de l'eau, des sédiments et/ou des tissus animaux.

Année	Auteur	Site	Observations
2006	Fabbri et al.	Italie (Est Adriatique)	10 – 30 ng/g de poids sec
2007	Perugini et al.	Italie (Est Adriatique)	44,1 – 63,3 ng/g de tissu sec
2007	Bihari et al.	Croatie (Nord)	305 ng/L d'eau 213 – 695 mg/kg de sédiment 49,2 – 134 ng/g de tissu sec
2007	Gambaro et al.	Italie (Est Adriatique)	0,16 – 373 ng/m <sup>3</sup> d'eau

**Tableau 2. Niveaux de contamination par les HAPs des animaux et de l'eau, en mer Adriatique**

Année	Auteur	Location	Observation
2006	Garaventa et al.	Rovinj	83 % d'imposex
2007	Scancar et al.	Slovénie (Nord adriatique)	0,98 µg Sn/g de sédiment 1,04 µg Sn/g de tissu
2007	Garaventa et al.	Rovinj	100 % d'imposex 280 ng Sn/g de tissu
2008	Milivojevic et al.	Slovénie (Nord adriatique)	maximum 600 ng Sn/L d'eau

**Tableau 3. Niveaux de contamination par le TBT des animaux et de l'eau, en mer Adriatique**

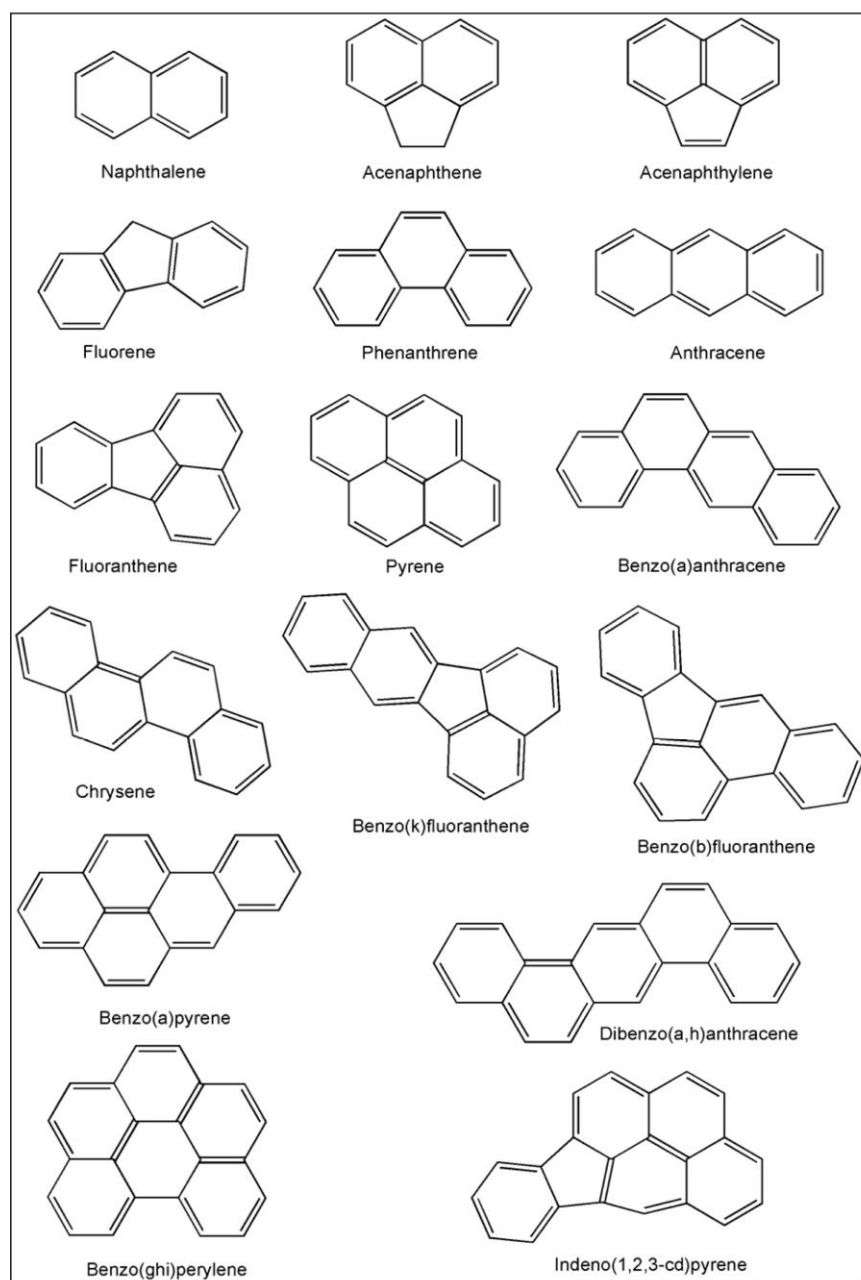
### Les HAPs

Ils sont naturellement produits lors de la combustion du bois et de divers composés organiques mais les activités anthropiques sont la principale cause de leur présence dans l'environnement marin (Budzinski et al., 1998). La source majeure de contamination du milieu océanique est le transport du pétrole et les chocs pétroliers (Torrey Canyon, 1967;



Amoco-Cadiz, 1978; Qualida, 1986; Exxon Valdez, 1989; Persan Gulf, 1991; Braer, 1993; Erika, 1999 ; Prestige, 2002).

Les HAPs sont des composés organiques constitués de deux ou plus noyaux aromatiques condensés. Les molécules sont planes, rigides, non polaires. Les noyaux aromatiques rendent les HAPs très hydrophobes. Leur hydrophobie augmente avec le nombre de cycles aromatiques, alors que leur solubilité et leur volatilité diminuent. Les HAPs susceptibles d'être présents dans le milieu aquatique ont de deux à dix noyaux aromatiques (Fig. 17). Au delà, leur solubilité est trop faible pour qu'ils soient détectés dans un environnement aqueux.



**Fig. 17. Structure chimique de 16 HAPs**

Les concentrations en HAPs sont inférieures à 25 µg/L dans une zone de référence considérée comme non polluée, de 50-100 µg/L dans une zone faiblement polluée et supérieures à 100 µg/L dans une zone fortement polluée (RNO, 2005). Des concentrations atteignant 8500 ng/L ont été rapportées dans certaines zones (Volkman, 2006). En Croatie, les concentrations rapportées dans le tableau 2 sont donc celles d'une zone fortement polluée.

Les HAPs s'adsorbent sur les particules solides et sont donc très présents dans les sédiments côtiers. Leur persistance dans l'environnement est toutefois plus limitée que celle des PCB (polychlorobiphényles) car ils sont sensibles à la lumière (dégradation photochimique). Cependant, plus leur poids moléculaire augmente, plus leur persistance dans le milieu s'accroît et plus ils s'accumulent dans le tissu adipeux des organismes vivants, *Mytilus edulis* par exemple (Pruell et al., 1986; McIntosh et al., 2004) et dans un temps très court (Enwere et al., 2009). Leur caractère lipophile leur confère une aptitude à franchir les membranes cellulaires et donc à être bioaccumulés dans les tissus. Ils sont métabolisés en composés plus hydrosolubles, ce qui facilite leur élimination.

La préoccupation majeure en ce qui concerne les hydrocarbures est liée à leurs propriétés potentiellement carcinogènes (Pelkonen et Nebert, 1982). C'est particulièrement le cas du benzo(a)pyrène, du benzo-anthracène et du benzo-fluoranthène (Solhaug et al., 2004 ; Gorria et al., 2006; Holme et al., 2007; Huc et al., 2007; Landvik et al., 2007), classés dans la catégorie 2 des substances potentiellement carcinogènes (Directive Substances Dangereuses 67/548/CEE INERIS, 2005).

Ce sont des composés génotoxiques. Leur génotoxicité est due à la formation, lors des mécanismes de détoxification, de composés électrophiles qui se fixent sur l'ADN et l'ARN, provoquant des dysfonctionnements cellulaires pouvant conduire au développement de cancers.

Concernant plus spécifiquement les invertébrés marins, des travaux ont montré chez l'huître *C. virginica*, par exemple, un effet des HAPs sur les hémocytes (nombre, activité bactéricide...) (Fisher et al., 2000 ; Oliver et al., 2001). Une augmentation des enzymes de détoxification a été rapportée chez des bivalves (moules, gastéropodes) exposés à ces polluants (lysozyme, SOD, catalase, NADPH-P450 reductase) (Porte et al., 1991 ; Sole et al., 1994 ; Akcha et al., 2000 ; Orbea et al., 2002 ; Fisher et al., 2003). L'activation par phosphorylation des protéines tyrosine kinases a été constatée chez la moule *M. edulis*

(Burlando et al., 2006). En outre, leur génotoxicité a été démontrée chez de nombreux invertébrés marins (Wessel et al., 2007 ; Skarphedinsdottir et al., 2007 ; Thomas et al., 2007 ; Bocchetti et al., 2008 ; Rank, 2009 ; Bonnard et al., 2009).

## **TBT**

Il s'agit d'un composé organométallique utilisé comme biocide dans des peintures antisalissures (Strandenes, 2000 ; Diez et al., 2005, 2006 ; Song et al., 2005) destinées à protéger la carène des navires de la fixation d'organismes marins. Elles agissent en diffusant dans le milieu des quantités importantes de TBT de l'ordre de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{jour}^{-1}$  (IFREMER, 2006). Ce composé sert aussi d'antifongique dans l'industrie du papier (Gadd, 2000), du cuir et du textile, dans les circuits de refroidissement ou comme désinfectant et biocide dans les tours de réfrigération, les centrales électriques et en milieu hospitalier. Il est également employé comme agent répulsif pour rongeurs, comme anti-parasitaire et dans certains produits « grand public » comme les oreillers anti-allergéniques (RPA, 2003).

La réglementation a interdit l'usage du TBT dans les peintures antisalissures à partir de 2008 (Organisation Maritime Internationale). Cependant, ce composé est encore présent sur la coque de nombreux bateaux. Dans l'eau de mer, il est à l'état d'hydroxyde, de carbonate ou chlorure ; il est faiblement associé aux matières en suspension (Ade et al., 1996 ; Burton et al., 2004 ; Diez et al., 2005 ; Pelletier et al., 2006) comme ses deux produits de dégradation, le dibutylétain et le monobutylétain (Greaves et Unger, 1988).

Plusieurs facteurs influencent la distribution du TBT dans les compartiments géologiques, hydriques et biologiques (Bhosle et al., 2004 ; Lee et al., 2006). Sa répartition obéit aux variations saisonnières (Buggy et Tobin, 2006) d'origine climatique. Elle est aussi en relation avec le trafic maritime. Le TBT est dégradé en milieu aquatique par action microbienne et photolytique (Cima et al., 1998 a et b ; Stasinakis et al., 2005 ; Bernat et Dlugonski, 2006 ; Diez et al., 2006 ; Dobretsof et al., 2006 ; Suehiro et al., 2006). Sa durée de vie dans l'eau varie de quelques jours à quelques semaines, alors que dans les sédiments, il est beaucoup plus stable et peut persister plusieurs années (Burton et al., 2006). Les concentrations de TBT au niveau des zones portuaires varient entre 100 et 1000 ng/L (Volkman, 2006). En mer Adriatique, quelques études récentes ont porté sur le dosage du TBT (Tableau 3).

En étudiant la concentration en TBT dans les organismes vivants, on constate que ce composé est bioaccumulé au long des chaînes trophiques, en allant des herbi-détritivores, que sont les

mollusques, aux carnivores primaires et secondaires, que sont les poissons et les oiseaux marins (De Long et Rice, 1997 ; Heidrich et al., 2001 ; Regoli et al., 2001 ; Makita et al., 2003, 2004 ; Oliver et al., 2003 ; Dwivedi et Tombetta, 2006 ; Veltman et al., 2006).

Les mollusques sont connus comme espèces sensibles au TBT, toxique pour ces organismes à des concentrations extrêmement faibles (inférieures à 0,5µg/L) comme le rapportent divers auteurs (Bech, 2002a et c ; Bech et al., 2002b ; Fernandez et al., 2002 ; Hong et al., 2002 ; Chiavarini et al., 2003 ; Duft et al., 2003 ; Gagne et al., 2003 ; Gibson et Wilson, 2003 ; Marshall et Rajkumar, 2003 ; Oliver et al., 2003 ; Inoue et al., 2004 ; Janer et al., 2004 ; Leung et al., 2004 ; Nishikawa et al., 2004 ; Pellizzato et al., 2004 ; Horiguchi et al., 2005 ; Jorundsdottir et al., 2005 ; Meng et al., 2005 ; Inoue et al., 2006 ; Hagger et al., 2006).

Il provoque le phénomène dit d'« imposex », qui se traduit par l'imposition de caractères mâles chez des animaux femelles (Oehlmann et al., 1996 ; Huet et al., 1996 ; Fernandez et al., 2005 ; Jorundsdottir et al., 2005 ; Santos et al., 2005 ; Janer et al., 2006 ; Hagger et al., 2006 ; et al., 2006b ; Horiguchi, 2006a ; Viglino et al., 2006).

Il induit également des anomalies au niveau de la coquille comme l'indiquent les travaux de Alzieu et al. (1981-1982) pour l'huître. Le TBT est un composé lipophile, qui s'accumule dans certains tissus comme ceux des branchies et de l'appareil digestif des mollusques (Goulon et Yong, 1995). Il provoque un ralentissement de la croissance comme l'observent Seinen et al. (1981) et Fent (1992) chez des crustacés. Il peut induire une mortalité importante des crustacés et des poissons (par exemple pour des expositions de 1 µg/L pendant 48 h) (Ohji et al., 2005 ; Liu et al., 2005 ; Dural et al., 2006 ; Durham et Snow, 2006 ; Hassani et al., 2006).

Concernant l'étude des voies de signalisation intracellulaire chez les animaux aquatiques, une activation des MAPKs par le TBT a été démontrée chez la truite (Owuor et Kong, 2002 ; Urishiriba et al., 2009), les ascidies (Damiani et al., 2009). D'autres protéines comme la Krs (Kinase répondant au stress) et la protéine kinase C sont induites chez l'éponge en réponse à ce composé (Fafandel et al., 2003).

L'effet du TBT sur l'induction de l'apoptose a aussi été démontré chez les moules *M. galloprovincialis* et *M. edulis* (Micic et al., 2001) et chez l'éponge (Batel et al., 1993).

#### **4. Objectif de l'étude**

L'objectif de ce travail est :

- d'identifier les gènes des 3 principales MAP kinases, p38, JNK et ERK de la moule *Mytilus galloprovincialis*, ces gènes ayant déjà été séquencés chez l'éponge *Suberites domuncula*,
- de mettre en place un test ELISA indirect applicable à la moule et à l'éponge pour la détection des formes phosphorylées et non phosphorylées des MAP kinases,
- d'étudier en laboratoire, l'effet de deux types de polluants marins, le TBT et les HAPs, sur l'activation de ces MAP kinases et sur l'une des réponses cellulaires à une telle activation, l'apoptose,
- de compléter ce travail par une approche *in situ*, en analysant le niveau d'expression des MAPKs chez des moules prélevées dans des sites non pollués et plus ou moins pollués de la côte croate.

Nous présenterons successivement dans ce mémoire, les données concernant l'éponge puis celles obtenues pour la moule. Ces résultats ayant fait l'objet de 2 publications, l'une acceptée (**Châtel A., Hamer B., Talarmin H., Dorange G., Schröder, H.C., Müller W.E.G. (2009) Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution - Aquatic toxicology**), l'autre soumise (**Châtel A. and Talarmin H., Hamer B., Schröder, H.C., Müller W.E.G., Dorange G. Apoptosis in the sponge *Suberites domuncula* exposed to pollutants – Aquatic toxicology**) et étant intégrés dans un chapitre d'ouvrage (**Müller W.E.G., Custódio M.R., Wiens M., Zilberberg C., Châtel A., Müller I.M., Schröder H.C. (2009) Stem cell pattern in Porifera : Effect of bacterial infection , dont je suis co-auteur**), le bilan de nos travaux sera présenté succinctement en complément des articles joints à ce mémoire pour les deux espèces étudiées.

## MATERIEL ET METHODES

## **1. Matériel biologique**

### **1.1. L'éponge *Suberites domuncula***

#### *Stabulation*

Les éponges *S. domuncula* sont collectées à Rovinj (Mer Adriatique, Croatie) à des profondeurs allant de 15 à 35 m. Elles sont maintenues en stabulation en aquarium, au laboratoire (Mainz Allemagne), à une température de 16°C, en eau de mer reconstituée, oxygénée par bullage, renouvelée au 1/3 tous les quinze jours (Fig. 1). Ce type d'organisme se développe sur une coquille dans laquelle vit un crabe *Pagurites osculatus*. Seuls les crabes sont nourris 2 fois par semaine (« Hermit Crab Meal » Tetrafauna). Cet apport nutritif permet le bon développement de l'exosquelette des deux organismes.



**Fig. 1. Stabulation des éponges en aquarium**

Pour les tests, l'éponge est découpée en boîte de Pétri dans de l'eau de mer, en fragments de 0,5 cm de long sur 0,2 cm de large.

### **1.2. La moule *Mytilus galloprovincialis***

Pour l'exposition à des polluants en laboratoire, les moules *M. galloprovincialis* proviennent d'un site conchylicole de Riviera (Croatie) ; elles sont maintenues pendant au moins 1 semaine en stabulation dans un aquarium en vue des expérimentations. Elles sont nourries une fois par semaine avec un mélange de microalgues. L'eau est renouvelée pour moitié toutes les semaines (Fig. 2).



**Fig. 2. Stabulation des moules *M. galloprovincialis***

Pour l'étude *in situ*, les moules sont collectées pendant l'été et l'hiver 2007, dans les 19 stations de la côte Adriatique, répertoriées dans la figure 4. Les branchies des moules sont disséquées (Fig.3) sur le dernier site de chaque « lot de stations » de prélèvement (1 à 6), (7 à 9), (10 à 12), (13 à 15), (16 à 17) et (18 à 19) puis congelées dans l'azote liquide, avant d'être stockées à -80°C pour les analyses.



**Fig 3. Moule ouverte situant les branchies**



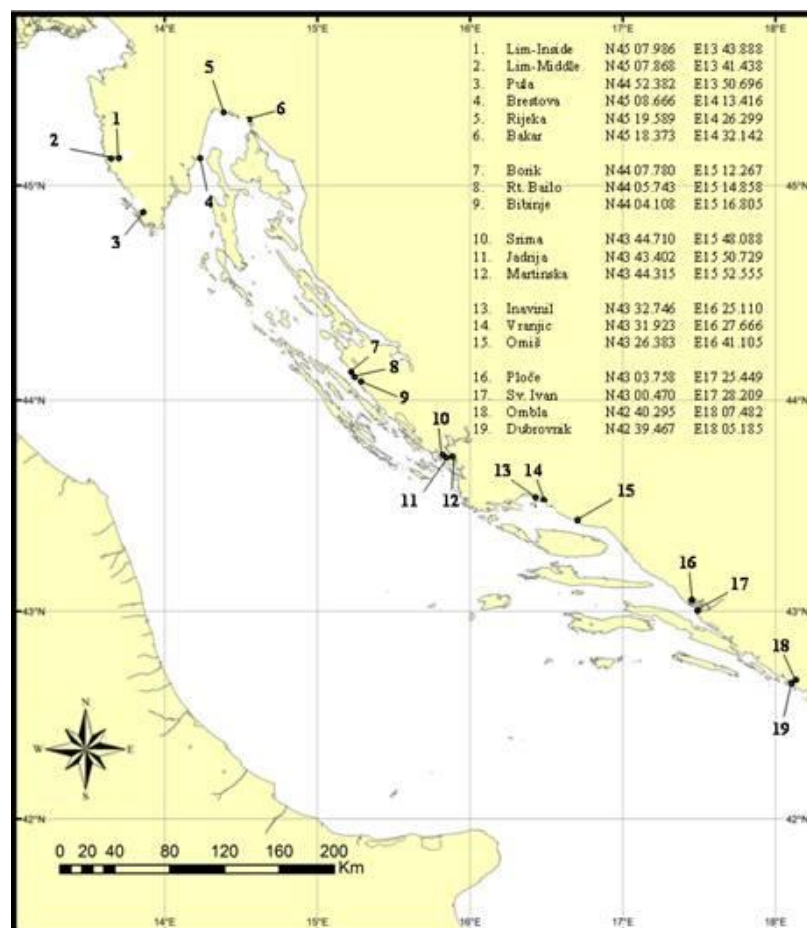


Fig. 4. Sites de prélèvement des moules en mer adriatique pour l'approche *in situ*

## 2. Composés testés

### 2.1. Lipopolysaccharides bactériens

Les animaux sont exposés aux lipopolysaccharides (LPS, L2880, Sigma, Deisenhofen, Germany) à une concentration de 10 µg/mL de PBS afin de développer un test ELISA. Des analyses sont effectuées après des temps d'incubation de 5 min à 24 h.

### 2.2. Composé organométallique : le tributylétain (TBT)

Le TBT (T50202, Sigma Aldrich) est dilué dans de l'éthanol avant d'être dilué dans de l'eau de mer. Une gamme de concentration de 11, 33, 100 et 33 µg/mL est préparée. L'exposition dure 1 h puis les animaux sont remis dans de l'eau de mer pour une période de récupération de 6 et 24 h.

### 2.3. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène ou  $H_2O_2$  (30% (v/v) Sigma - H1009 ) est directement dilué dans de l'eau de mer à des concentrations de 0,074, 0,222, 0,666, 2 mmol/L. L'exposition dure 1 heure puis les animaux sont mis en eau de mer pendant 6 et 24 h.

### 2.4. Hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs)

1L de pétrole est mélangé avec 4L d'eau de mer, selon Baden (1982) et mis sous agitation douce pendant 24h, afin d'extraire les composés hydrosolubles. Après 3h de maintien sans agitation, le mélange est filtré. La fraction hydrosoluble est décantée (Aflolabi et al., 1985).

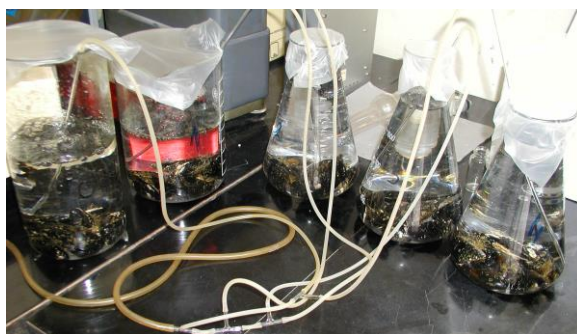
Ce mélange est dilué à 3,25, 7,5, 15 et 30 % dans de l'eau de mer stérile. Les animaux sont immergés pendant une heure dans les différents mélanges puis remis dans de l'eau de mer stérile pendant 6 et 24 h.

Pétrole (% dans de l'eau de mer)	3,25	7,5	15	30
Hydrocarbures ( $\mu\text{g/L}$ )	22,55	45,00	90,00	180,00

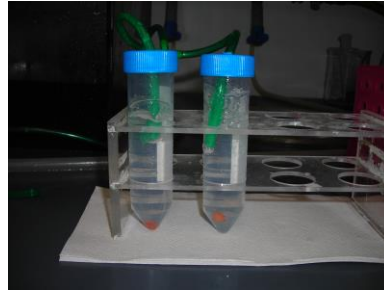
## 3. Méthodes

### 3.1. Traitement des animaux

L'exposition aux toxiques s'effectue sur organisme entier pour la moule (Fig. 5), alors que pour l'éponge, ce sont des fragments qui sont traités pour favoriser le contact direct des cellules avec les substances dont les effets sont étudiés (Fig. 6).



**Fig. 5. Incubation des moules *M. galloprovincialis* en milieu oxygéné**



**Fig. 6. Incubation des fragments d'éponge *S. domuncula* en tubes de 50 mL en milieu oxygéné**

### **3.2. Extraction protéique**

Après broyage des fragments d'éponge et des branchies de moule, l'homogénat est repris dans un tampon de lyse composé de TBS [tampon Tris], pH 7.5, 1 mM EDTA [acide tétra-acétique éthylène diamine], additionné de 1% Nonidet-P40, de 10 mM NaF [fluorure de sodium], d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche) et de 1 mM d'orthovanadate de sodium). Après centrifugation (13,000 x g ; 10min ; 4°C), le surnageant est prélevé pour le dosage protéique.

### **3.3. Dosage protéique**

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford, afin d'évaluer le volume à déposer dans chaque puits lors du test ELISA et pour les analyses par Western blot.

### **3.4. Développement d'un test ELISA indirect pour la mesure de l'activation des MAP kinases**

Ce test est basé sur la capacité des anticorps anti-MAP kinases à se fixer avec une forte affinité sur un motif spécifique de chaque MAPK. Après de nombreux essais, le protocole décrit ci-après a été retenu pour le test ELISA.

L'extrait protéique est déposé sur le fond des puits d'une plaque ELISA 96 puits (Pro-Bind Becton Dickinson, France) à une concentration de 400µg/mL de tampon PBS, pour une période de 3h à température ambiante. Après lavage au PBS/Tween 20 0,05% (v/v), les puits sont recouverts par une solution de BSA à 3% en PBS. Le traitement se fait à 4°C pendant 12h. Le taux des formes phosphorylées et totales de p38, JNK et ERK est mesuré après addition des anticorps spécifiques dilués à 0,3% dans du PBS/BSA et incubation pendant 1h. Un anticorps secondaire de chèvre couplé à la peroxydase (A4914, Sigma, Deisenhofen,

Germany) est ajouté. Une coloration bleue est obtenue par addition de 3,5,5-Tetramethylbenzidine (TMB) (medac GmbH). La réaction est arrêtée par ajout d'  $\text{H}_2\text{SO}_4$  puis la densité optique est mesurée à 450nm (Titertek MultiScan Plus).

### 3.5. Mesure de l'expression de Bcl-x L/S par Western blot

#### ➤ *Electrophorèse*

Les électrophorèses sont réalisées sur gel de polyacrylamide à 12% recouvert d'un gel de polyacrylamide à 6%. Après polymérisation des gels, les protéines dénaturées et le marqueur de poids moléculaire sont déposés dans les puits. La migration s'effectue à 30V pendant 1h, puis à 90V pendant environ 45 minutes dans du tampon de migration (Tris 72mM, Glycine 384mM, SDS 0,1%).

#### ➤ *Coloration du gel par le bleu de Coomassie (GelCode® Blue Stain Reagent Pierce)*

Le bleu de Coomassie® G-250 se fixe sur les protéines. Cette étape permet de contrôler la qualité des dépôts.

Après électrophorèse, le gel de polyacrylamide est lavé 2 fois à l'eau distillée, sous agitation, pendant 15 minutes. Puis il est mis à incuber dans 15 mL de GelCode® Blue Stain Reagent pendant 1 h à température ambiante. Il est ensuite lavé à l'eau distillée et séché. Puis l'intensité des bandes est évaluée à l'aide du logiciel Odyssey.

#### ➤ *Transfert*

Après avoir été immergée pendant 5 minutes dans du méthanol, une membrane de nitrocellulose est mise à incuber dans un tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, 20% méthanol) pendant 15 minutes. Puis, sont successivement déposés dans le système de transfert : 3 papiers Whatman (préablement imbibés de tampon de transfert), la membrane, le gel et à nouveau 3 papiers Whatman. Le transfert s'effectue en « Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cel » - (Bio-Rad) sous 0,04 A, par « sandwich », pendant 1 h environ.

La membrane est ensuite rincée au TBS 1X (Tris Buffer Saline : Tris 50mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) et placée toute la nuit à 4°C dans du TBS 1X contenant une solution de saturation des sites aspécifiques (Blocking reagent – ROCHE).

La membrane est mise à incuber pendant 1h30, à température ambiante, en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-Bclx (556361 - Pharmingen) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans du

TBS 1X additionné de la solution de saturation à 0,5% en tampon TBS 1X. Cet anticorps reconnaît les formes BclxL (Long) et BclxS (Small) humaines.

Après 3 lavages successifs de 5 minutes dans du TBS 1X / Tween 20 à 0,1%, la membrane est mise à incuber pendant une heure en présence du deuxième anticorps de lapin dilué dans du TBS 1X additionné de solution de saturation à 0,5% (anticorps de chèvre dirigé contre la partie constante des immunoglobulines G de lapin, couplé à la phosphatase alcaline – A9811 - Sigma). Elle est ensuite lavée 3 fois, pendant 5 minutes, dans du TBS 1X/Tween 0,1% puis 3 fois dans du TBS 1X. Après une incubation de 10 minutes dans du tampon Tris (Tris 0,1 M, NaCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 5mM), la membrane est mise en présence du substrat de la phosphatase alcaline, le BCIP (5-bromo 4-chloro-3indolyl phosphate) : 1,7 mg, 82,5µL de DMF (Diméthylformamide), 3,32 mg de NBT (Nitro Blue Tetrazolium), pour 10 mL de tampon Tris. Le BCIP, déphosphorylé par la phosphatase alcaline, est oxydé par le NBT et donne un précipité bleu-violet insoluble. Après 10 minutes à l'obscurité, on voit apparaître des bandes dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines. La réaction enzymatique est alors arrêtée en rinçant la membrane à l'eau. Le niveau d'expression des protéines est analysé par le logiciel Odyssée.

*N.B.* : Nous avons aussi appliqué cette procédure pour vérifier la spécificité des anticorps dirigés contre les MAP kinases que nous avons utilisés pour le test ELISA.

### **3.6. Mesure de la génotoxicité par le test fluorimétrique ou Fast Micromethod® (d'après Singh et al, 1988)**

Pour cette étude, le protocole suivi est celui défini par Batel et al. (1999). Il s'agit de dérouler l'ADN en conditions alcalines, afin de quantifier les cassures « simple brin ». Les cellules sont placées en plaque multi-puits avant d'être lysées par une solution contenant un détergent, en présence d'un fluorochrome, intercalant de l'ADN, le Picogreen. La fluorescence émise est mesurée et transformée en unités arbitraires de fluorescence, grâce à un fluorimètre relié à une interface informatique. L'intensité de la fluorescence diminue d'autant plus vite que la séparation des deux brins est rapide, en relation avec le nombre de cassures de brin.

Les tissus (100 mg) sont homogénéisés dans 2 mL d'un tampon TE pH 7.4 (1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl) additionné de DMSO 10 % dans un mortier préalablement refroidi à l'azote liquide. L'homogénat est filtré sur toile à bluter (porosité 75 µm) afin d'éliminer les débris

cellulaires. Après centrifugation (12000 rpm–5 min–4°C), le surnageant est prélevé. Le dosage s'effectue en utilisant le fluorochrome YOYO®-1-iodide qui possède une très forte affinité pour l'ADNdb et l'ADNsb. 50 µL de chaque échantillon traité ou témoin sont déposés dans une plaque 96 puits, puis 50 µL de YOYO®-1-iodide ( $4.10^{-7}$  M) sont ajoutés. Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, la fluorescence est mesurée (excitation 485 nm/ émission 520 nm) et la concentration d'ADN calculée. Les homogénats sont dilués pour obtenir une concentration d'ADN de 100 ng/mL dans du tampon TE/DMSO en vue de l'analyse par Fast micromethod®.

Dans une plaque noire, sont déposés 25µL d'ADN puis 25µL d'une solution de lyse (4.5 M Urée, EDTA 0,2 M, SDS 0.1 %, pH 10.0) additionnée de 2% de Picogreen® (P7581 - Interchim). Après 30 minutes de lyse à l'obscurité, 250 µL de solution alcaline sont ajoutés afin de dénaturer l'ADN. La plaque est ensuite placée dans un fluorimètre (Fluoroscanner reader, Labsystems) équipé d'un filtre d'excitation (485nm) et d'émission (535nm) et la mesure s'effectue toutes les 5 minutes pendant 20 minutes.

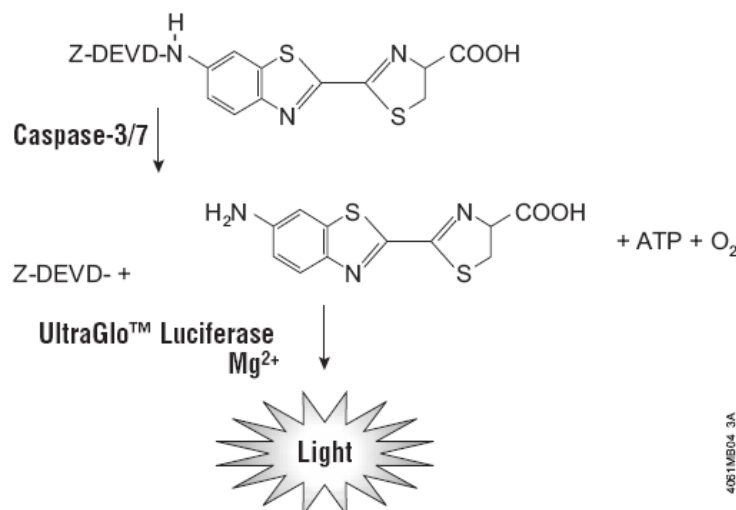
Un traitement des données est réalisé sous Excel afin de déterminer le Strand Scission Factor (SSF), résultant de la pente liée à la vitesse de dénaturation.

$$SSF = \log (\% \text{ ADN double brin échantillon} / \% \text{ ADN simple brin contrôle})$$

### **3.7. Mesure de l'activation de la caspase 3**

L'activité caspase 3 est mesurée sur des extraits protéiques de branchies de moule ou des extraits d'éponge conservés à -80°C en utilisant le kit Caspase 3/7 Glo (Promega). Le substrat de la caspase 3, le DEVD (Fig. 7), contient un peptide proluminescent. Après clivage par la caspase 3, l'aminoluciférine est libérée. Elle émet en présence de luciférase un signal luminescent (Fig. x). La luminescence est proportionnelle à la quantité de caspase 3 activée.

Dans une plaque blanche multipuits, pour luminescence, sont ajoutés 50 µL d'extrait protéique (10 µg/ml) puis 50 µL du tampon Caspase Glo. Après 1 h d'incubation, l'intensité de luminescence est mesurée à l'aide d'un luminomètre.



**Fig. 7. Clivage du substrat luminogène contenant le DEVD par la caspase 3 (d'après Promega)**

### 3.8. Etude histologique

Les fragments d'éponge ou les branchies de moule sont fixés sur une platine, en les orientant selon le plan de coupe souhaité, grâce à une colle spéciale (Tissue Tek). Le prélèvement est rapidement congelé dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Les prélèvements sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de la coupe au cryotome.

Des coupes de  $8\ \mu\text{m}$  sont effectuées et déposées sur lames puis sont maintenues à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse histologique.

#### 3.8.1. Coloration hémalum/éosine

Les coupes sont décongelées et maintenues pendant 12 h à température ambiante pour une bonne adhésion à la lame avant d'être colorées à l'hémalum pendant 3 min. Après lavage à l'eau courante pendant 2 min, un virage au bleu des noyaux est obtenu par passage dans de l'eau additionnée de carbonate de lithium. Après régression à l'éthanol  $70^{\circ}$  pendant 3 min, le cytoplasme est coloré à l'éosine pendant 2 min. Après déshydratation des coupes par 3 bains successifs de 5 min à l'éthanol  $95^{\circ}$ , puis à l'éthanol absolu et passage dans 3 bains de toluène, les coupes sont montées à l'Eukitt.

#### 3.8.2. Mesure de la fragmentation d'ADN par la méthode TUNEL

La méthode nommée TUNEL (Tdt-mediated dUTP-X nick end labeling), est basée sur la détection de cassures d'ADN double brin. Ces cassures peuvent être détectées par marquage

de l'extrémité 3'-OH avec des nucléotides couplés à un fluorochrome (dUTP couplé à la fluorescéine) puis d'une réaction enzymatique. L'enzyme TdT (terminal désoxynucléotidyl transférase) catalyse la polymérisation des désoxyribonucléotides situés à l'extrémité 3'-OH des ADN simple et double brin.

Le kit « In situ cell death detection kit, Fluorescein » (ROCHE), est utilisé pour cette technique. Les échantillons sont fixés au paraformaldéhyde dilué à 4 % en tampon PBS. Après 30 min de lavage au PBS, les coupes sont incubées en présence du tampon de perméabilisation (0.1% Triton X100, 0.1% de citrate de sodium) pendant 2 min, à 4°C. Elles sont mises à incuber dans un tampon contenant la TdT additionnée des nucléotides marqués. Pendant cette incubation, la TdT catalyse l'addition de dUTP-fluorescéine sur les groupes libres 3'-OH des ADN simple et double brin. Après une étape de lavage par du PBS, le marqueur, fixé sur les extrémités 3'-OH de l'ADN, est visualisé par microscopie à fluorescence.

### **3.9. Séquençage des MAP kinases chez la moule *Mytilus galloprovincialis***

#### ***Extraction des ARN de branchies***

L'extraction des ARN totaux est réalisée en utilisant le TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen) selon une méthode basée sur la technique de Chomczynski et Sacchi (1987).

0.1-0.2 g de branchies fraîchement prélevées sont lysés par 1 mL de TRIZOL<sup>®</sup> puis 200 µL de chloroforme sont ajoutés. Après agitation vigoureuse, le lysat est maintenu à température ambiante pendant 3 min et centrifugé (12000g, 15 min à 4°C). La phase aqueuse supérieure, contenant les ARN, est prélevée. Leur précipitation est obtenue par addition de 500 µL d'isopropanol et 10 min d'incubation à température ambiante. Les ARN sont concentrés par centrifugation (12000g, 10 min à 4°C), lavés par de l'éthanol 75°, centrifugés (7500g, 5 min à 4°C), et séchés. Ils sont ensuite repris dans de l'eau ne contenant pas de RNase puis dosés par spectrophotométrie à 260 nm. Les ARN sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

#### ***Transcription inverse***

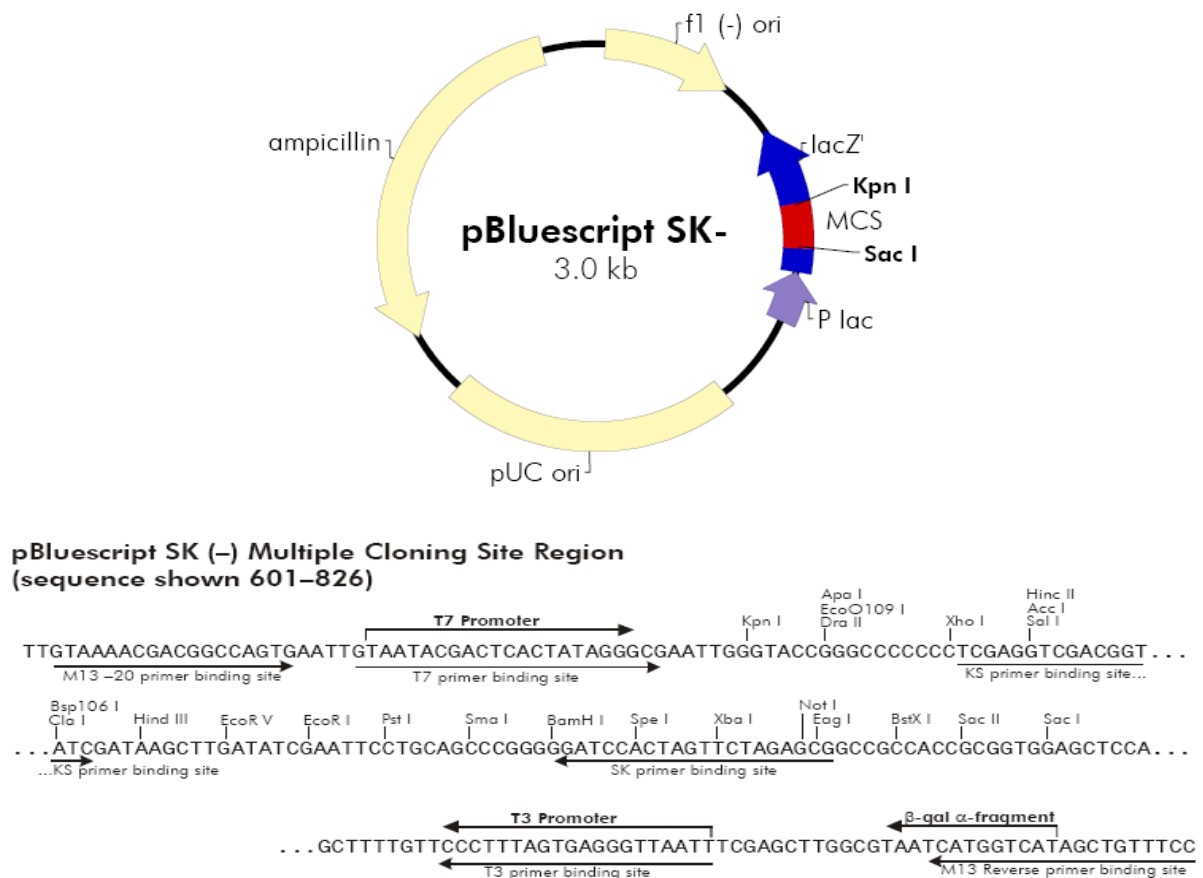
La transcription inverse ou RT (« reverse transcription ») est réalisée à l'aide du kit « Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix » (Invitrogen) à partir des ARN totaux. Pour chaque échantillon, 1 µL de tampon Annealing, 1 µL d'oligo dT 50 µM ou 2 µM d'amorces gène-spécifiques, sont mélangés à 5 µg d'ARN totaux. Chaque mélange est complété à 8 µL avec de l'eau dépourvue de RNase pour une incubation de 10 min à 65°C. Puis 10 µL de 2X First-Strand Reaction Mix ainsi que 2 µL de SuperScript III/RNase out Enzyme MIX sont



ajoutés. Après incubation pendant 50 minutes à 50°C puis 5 minutes à 85°C, les ADNc ainsi synthétisés, sont stockés à -20°C.

### **Banque d'ADNc**

Une banque d'ADNc, fournie par le laboratoire de Rovinj (Croatie), a été utilisée en parallèle de l'ADNc synthétisé. Elle a été construite à partir des branchies de moule *M. galloprovincialis*. Les ARN totaux sont rétro-transcrits en ADNc puis incorporés dans le phagemide pBluescript® SK- (Fig. 8).



**Fig. 8. Le phagemide pBluescript® SK- (d'après Invitrogen)**

### ***Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)***

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique permettant d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN. Pour chaque tube, le mélange est le suivant :

	Concentration	Volume
Tampon de PCR	10 X	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	1 µL
dNTPs	10 nmol	1 µL
Amorce Forward	10 pmol	1,5 µL
Amorce Reverse	10 pmol	1,5 µL
Taq-Polymerase	1 U	0,2 µL
ADNc	-	Concentration finale : 1 ng
H <sub>2</sub> O	-	qsp 50 µL

Les tubes sont ensuite placés dans le Thermocycleur pour traiter les échantillons selon les conditions suivantes :

Cycle 1:	1-3 min	95°C	Dénaturation initiale
Cycles 2-25:	30 sec	95°C	Dénaturation
	30 sec	T <sub>m</sub>	Hybridation des amorces
	15 sec-15 min (selon la taille du produit)	70°C-72°C	Elongation
Cycle 26:	5 sec-10 min	70-72°C	Elongation finale

La température d'hybridation des amorces dépend de la température de demi-dénaturation des amorces (ou T<sub>m</sub>). Elle se calcule selon la formule définie par Thein et al., 1986 :

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

### Amorces vecteur-spécifiques

T3	5' CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG 3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
T7	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'	T <sub>m</sub> = 64 °C
SP6	5' TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT CA 3'	T <sub>m</sub> = 55 °C
SP6 800	5' CTATTTAGGTGACACTATAG 3'	T <sub>m</sub> = 51 °C
T7 800	5' GTAATACGACTCACTATAGG 3'	T <sub>m</sub> = 53 °C

### Amorces vecteur-spécifiques marquées utilisées pour le séquençage

SP6 <sub>700</sub>	5' – CTA TTT AGG TGA CAC TAT AG – 3'	T <sub>m</sub> = 51°C
SP6 <sub>800</sub>	5' – CTA TTT AGG TGA CAC TAT AG – 3'	T <sub>m</sub> = 51°C
T7 <sub>700</sub>	5' – GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG – 3'	T <sub>m</sub> = 53°C
T7 <sub>800</sub>	5' – GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG – 3'	T <sub>m</sub> = 53°C

### Amorces gène-spécifiques

JNK-Fa	5' GAA GAA CTA TAA GAG C 3'	T <sub>m</sub> = 44 °C
JNK_Fb	5' GAA TAA TTC TGT TCA ACC 3'	T <sub>m</sub> = 47 °C
JNK_R	5' TTG CTA ATC CAA AGT C 3'	T <sub>m</sub> = 46 °C
JNK_F1	5'ATC TTG TGA TGG AAT TAA TGG ATG C 3'	T <sub>m</sub> = 48 °C
JNK_F2	5'CAG ATA CTG TGT GGT ATC AAA CAT CTA C 3'	T <sub>m</sub> = 52 °C
JNK_R1	5'GGG AAC ATT TGT TTG AGT AAG TAT CAC A 3'	T <sub>m</sub> = 50 °C

ERK_Fa	5' ATT GGT ATT GGG GCA TAT GG 3'	T <sub>m</sub> = 55 °C
ERK_Fb	5' CTT AAT GGA AAG TGA TCT GC 3'	T <sub>m</sub> = 53 °C

ERK_R	5' ACA TGA TCT CTG GTG CTC G 3'	T <sub>m</sub> = 56 °C
ERK_F1	5' TAT ATT CAT TAT TGA AAA CGT C 3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
ERK_F2	5' GTT ATG GCT CGA GGT TTA TT 3'	T <sub>m</sub> = 68 °C
ERK_R1	5' ATG TAA TGG TTT GGT TCT TCT GG 3'	T <sub>m</sub> = 64 °C

Les produits de PCR sont déposés immédiatement sur gel d'agarose 1% (Euromedex, D-5C) en présence de bromure d'éthidium (BEt) (Sigma, E8751) à 400ng/mL. L'amplification est révélée par exposition aux U.V.

### ***Excision de l'ADN d'un gel d'agarose***

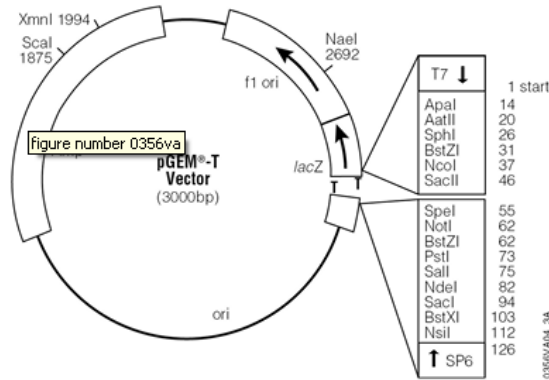
Après une courte immersion du gel dans un bain de BEt, l'ADN est excisé sur un lecteur UV, puis purifié en utilisant le kit « NucleoSpin® extract II kit - Macherey-Nagel ou « high pure PCR product purification kit » (Roche). L'ADN est ensuite repris dans de l'eau exempte de nucléases.

### ***Clonage***

La méthode clonage « AT », technique la plus employée pour cloner des fragments d'ADN, est utilisée dans le cadre de ce travail. Le vecteur est préparé par addition de thymidine, au niveau des extrémités 3' du site d'insertion, permettant ainsi une forte interaction avec les fragments à insérer puisque les polymérases additionnent généralement une desoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. Ceci a pour avantage d'améliorer l'efficacité de ligation du produit de PCR en prévenant une recircularisation du vecteur. La ligation avec le vecteur pGEM®-T (A3600 - Promega) (Fig. 9) est réalisée à 4°C pendant une nuit, ou à température ambiante pendant 1 h, selon les conditions recommandées par le fournisseur.

Pour 10 µL, le mélange réactionnel est le suivant :

Tampon de clonage	5 µL
pGEMT vector	0,8 µL
PCR product	3,2 µL
T4 DNA ligase	1 µL



**Fig. 9. Le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T (d'après Promega)**

### ***Transformation dans des bactéries compétentes***

1,8 µL de produit de ligation sont transformés dans des bactéries NovaBlue thermocompétentes par un choc thermique de 30 secondes à 42°C selon les recommandations du fournisseur. Puis les bactéries sont mises à incuber dans 150 µL de milieu SOC pendant 1h30 à 37°C, sous agitation, afin qu'elles puissent exprimer le marqueur de résistance à l'ampicilline codé par le plasmide. Elles sont ensuiteensemencées en boîtes de Pétri sur du milieu LB (Luria Bertani) additionné d'agar 1,5% (EU0031-Euromedex), et de 50µg/mL d'ampicilline (UA2262 - Euromedex) pour la sélection des bactéries transformées, d'IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (I8500 - Euromedex) pour l'induction de l'opéron lactose et de X-gal (EU0012-B - Euromedex) comme substrat de la βgalactosidase.

L'utilisation du vecteur pGEM<sup>®</sup>-T, comportant à la fois une séquence Lac Z et un site multiple de clonage MSC (partie de l'opéron lactose manquante dans les bactéries compétentes), permet la distinction entre les colonies bactériennes transformées, blanches, et les colonies non transformées, bleues, dues à la recircularisation du vecteur en absence d'insert.

### ***Checking PCR***

La "checking PCR" est mise en oeuvre afin de vérifier l'intégrité de l'insert présent dans les vecteurs des colonies blanches. Les bactéries des colonies blanches sont sélectionnées à l'aide d'un cône stérile et introduites dans un tube contenant 12 µL de milieu LB/ampicilline. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 2 µL de la suspension bactérienne sont utilisés pour disposer d'ADNc comme lors d'une réaction de PCR standard, réalisée dans un volume final de 10 µL, en utilisant les amorces spécifiques du vecteur pGEM<sup>®</sup>-T : SP6 et T7.

Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose à 1 % et les colonies possédant les plasmides de taille attendue sont remises à cultiver dans 5 mL de milieu LB/ampicilline, à 37°C, une nuit, sous agitation.

### ***Extraction plasmidique***

Les plasmides sont isolés des cultures bactériennes en utilisant le kit High pure plasmid isolation (ROCHE), selon les recommandations du fournisseur. Une lyse des bactéries en conditions alcalines permet de libérer le plasmide des cellules. Après élimination des débris et de l'ADN chromosomique, le surnageant est filtré (fibres de verre). Ce filtre retient de manière spécifique les acides nucléiques en présence de sels chaotropiques (guanidine HCl). Après élimination des protéines et des sels, l'ADN est élué par un tampon pauvre en sel ou par de l'eau exempte de nucléase. La concentration en ADN est ensuite estimée par spectrophotométrie à 600 nm.

### ***PCR de séquençage***

La PCR est réalisée en utilisant la technique de Sanger. Cette méthode utilise un ADNsb (1,5 µg), une seule amorce (2-4 pmol/µl), une ADN polymérase, des nucléotides et des nucléotides modifiés fluorescents qui terminent l'élongation du brin d'ADN. Quatre réactions de séquençage séparées sont réalisées. Dans chaque cas, les 4 désoxynucléotides standards (dATP, dGTP, dCTP and dTTP) et de l'ADN polymérase sont mélangés. Pour chaque réaction, seul un des 4 didéoxynucléotides ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est présent. La réaction consiste à terminer la synthèse du brin d'ADN, en enlevant un groupe 3'-OH nécessaire à la formation d'une liaison phosphodiester entre 2 nucléotides durant l'élongation de l'ADN. L'incorporation de ces ddNTP crée des fragments d'ADN de longueur variable. La PCR de séquençage est réalisée dans les conditions suivantes :

Cycle 1	2 min	95°C
Cycles 2-30	20 sec	95°C
	20 sec	54°C
	45 sec	70°C
Cycles 31-45	30 sec	95°C
	30 sec	72°C

Aux mélanges réactionnels sont ajoutés 4 µL de formamide additionné de bleu de bromophénol. Les échantillons sont ensuite dénaturés à 95°C pendant 5 minutes et séparés selon leur taille sur gel de polyacrylamide et détectés par un laser infrarouge. Chacun des composés migre dans un puits individuel (G, A, T, C). La séquence du gène est ensuite déterminée à l'aide du logiciel e-Seq V2.0 DNA.

### ***Analyse des données***

L'analyse des séquences d'ADN se fait grâce à plusieurs logiciels :

BLAST	<a href="http://genome.eerie.fr/blast/blast-query.html">http://genome.eerie.fr/blast/blast-query.html</a> Altschul et al., 1990
CLUSTAL V1.81	Freeware: ftp.ebi.ac.uk Thompson et al., 1994
DNASStar V6	DNASStar Inc.
e-Seq V2.0 DNA	LI-COR, MWG Ebersberg
ExPASy	<a href="http://www.expasy.org/tools/protparam.html">http://www.expasy.org/tools/protparam.html</a> Gasteiger et al., 2003
GENEDOC	www.cris.com Nicholas et al., 1997
Vector NTI Suite	<a href="http://www.invitrogen.com">http://www.invitrogen.com</a>

### **3.10. Analyse statistique des données**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écarts-type (ET). Le test d'analyse de variance (ANOVA) et de Tukey sont utilisés pour la comparaison des données au seuil de 0,05.

# CHAPITRE 1

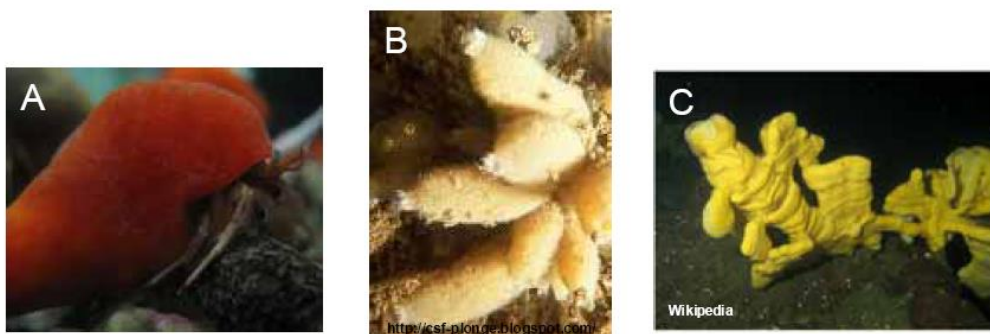
L'éponge *Suberites domuncula*  
comme modèle d'étude



## I. Introduction

Les éponges de mer (*phylum Porifera*) représentent les métazoaires les plus anciens et les plus primitifs (Haeckel, 1896 ; Orlov, 1971 ; Valentine, 1994), apparus il y a 600 à 800 millions d'années (Müller et al., 1994 ; Müller, 2001). 1500 espèces sont décrites et 800 espèces sont bien caractérisées (Hooper et Van Soest, 2002).

Il existe 3 classes d'éponges, en fonction de la composition de leur squelette (les spicules) : les *Calcarea* (squelette de carbonate de calcium), les *Demospongia* (90% des espèces au squelette composé de fibres de spongine et/ou de silice minérale) et les *Hexactinellida* (composées de cristaux de silice) (Simpson, 1984 ; Müller et al., 1997 ; Schutze et al., 2001 ; Hooper et Van Soest, 2003) (Fig.1).



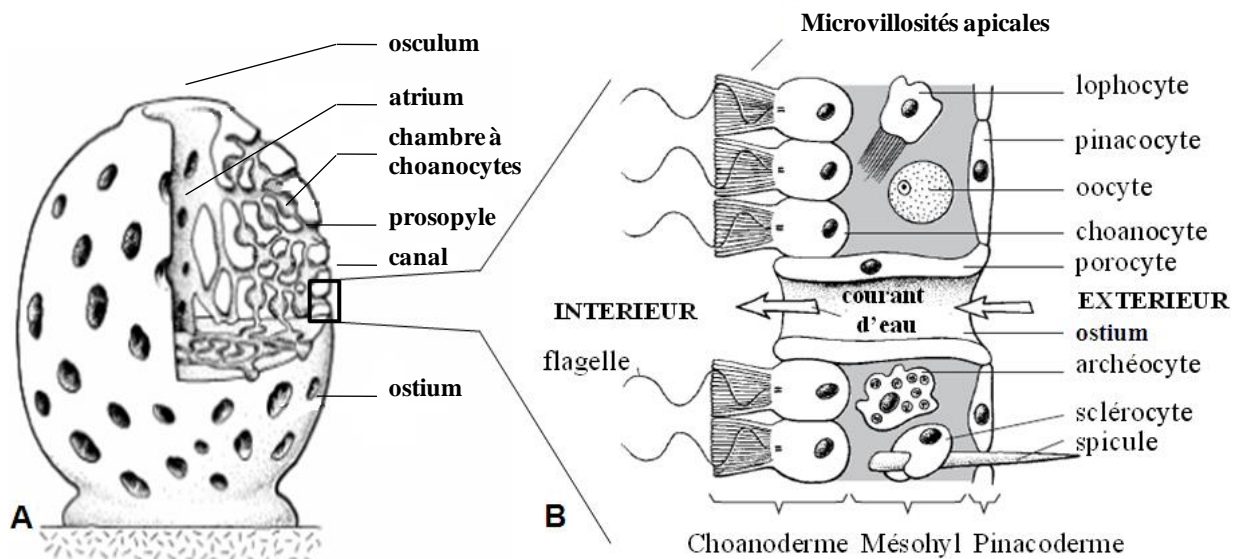
**Fig. 1. Exemples d'éponges appartenant aux classes de Porifera. (A) *Suberites domuncula* (*Demospongia*), (B) *Sycon raphanus* (*Calcarea*) et (C) *Aphrocallistes vastus* (*Hexactinellida*).**

Ces animaux sont présents dans toutes les mers du globe, de l'Arctique aux mers tropicales, et leur habitat va de la zone intertidale à des profondeurs de 8500 m. Les éponges sont principalement marines, sauf celles appartenant à la famille des *Spongillidae* qui vivent dans l'eau douce. L'importante diversité des éponges dans la zone de Rovinj en Croatie (environ 200 espèces repertoriées) explique le choix du site pour leur prélèvement (Müller et al., 2004 ; Brümmer et al., 2004).

Ces organismes sont généralement sessiles, fixées aux roches, aux épaves ou aux algues et sur des coquilles, bien que certains soient capables de se déplacer lentement (jusqu'à 4 mm par jour).

## Anatomie – Structure

Au plan structural (Fig. 2), la paroi des *Demospongia*, classe à laquelle est rattachée *S. domuncula*, est composée de cellules constituant deux familles de tissus, l'un de type épithélium simple, qualifié d' « épithélioïde » du fait de l'absence de jonctions intercellulaires et de lame basale, l'autre de type conjonctif (Ruppert et al., 2004).



**Fig.2. A. Anatomie et structure de l'éponge – B : coupe de la paroi (modifié selon Rigby, 1987)**

Concernant le tissu « épithélioïde », on distingue selon les données de la littérature (Rigby, 1987) :

- le pinacoderme qui couvre la surface externe de l'éponge (exopinacoderme) et longe les canaux inhalants et exhalants (exopinacoderme). Il est constitué de 2 types de cellules pavimenteuses dont la plus fréquente est le pinacocyte, dépourvu de flagelles chez *S. domuncula*. L'autre type est le porocyte, délimitant les *ostia* ou pores qui perforent toute la paroi de l'éponge et dont le diamètre est déterminé par la contraction de filaments cytoplasmiques.
- le choanoderme, constitué d'une couche de cellules cubiques à prismatiques flagellées et à microvillosités ; il délimite l'atrium interne ou spongocoele.

Entre le pinacoderme et le choanoderme, se trouve le tissu conjonctif, dénommé mésohyle. Au sein de la matrice de ce mésohyle, on distingue des cellules indifférenciées et différenciées (Müller et al., 2009), parmi lesquelles les archéocytes, à fonction

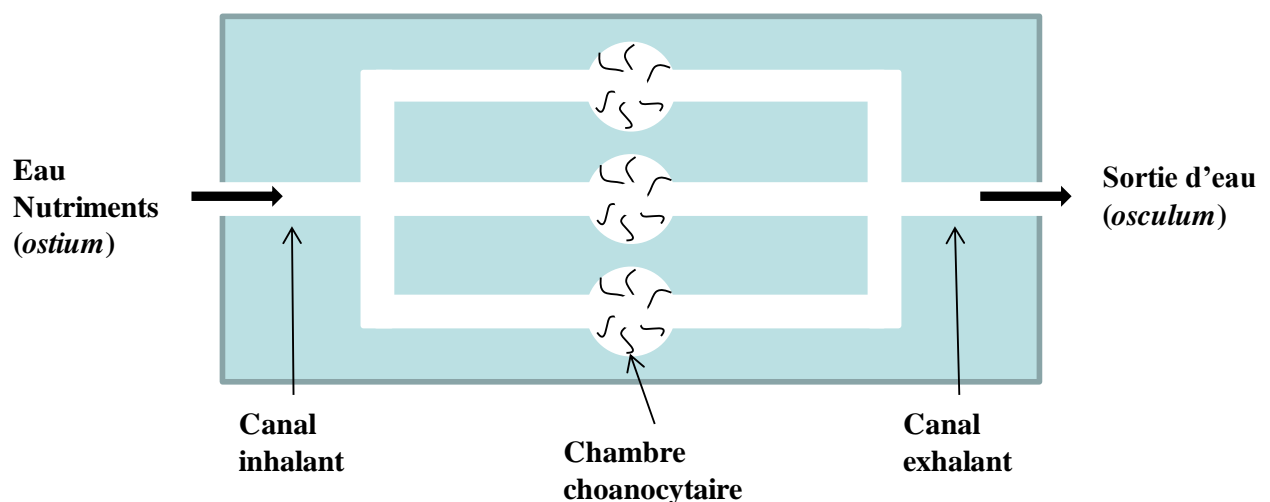
macrophagique, et les lophocytes, qui sécrètent le collagène de la matrice. Des sclérocytes sécrètent les spicules (Müller et al., 2003).

En outre, des myocytes, situés autour de l'*osculum* dont ils régulent le diamètre d'ouverture (Simpson, 1984), participent au contrôle du flux d'eau circulant dans l'éponge.

Enfin, c'est au sein du tissu conjonctif que mûrissent les cellules sexuelles mâles et femelles.

Comme l'indique leur phylum (*Porifera* : *porus* « pore » et *ferre* « transporter »), les éponges peuvent filtrer des milliers de litres d'eau de mer par heure (Vogel, 1977 ; Bergquist, 1978).

L'eau est aspirée au niveau des pores inhalants. Elle circule jusqu'aux choanocytes, cellules spécialisées dans la création de courants et la rétention de particules grâce aux battements des flagelles, puis elle est rejetée dans un système collecteur de canaux exhalants aboutissant à l'*osculum* (Fig. 3).



**Fig. 3. Représentation de la circulation de l'eau chez les éponges (d'après Reiswig, 1975)**

La rétention de particules, très efficace mais non sélective (Pile et al., 1996 ; Reiswig, 1971 ; Ribes et al., 1999), se produit principalement au niveau *i)* des pinacocytes pour des particules de diamètre compris entre 5 et 50  $\mu\text{m}$  et *ii)* des choanocytes pour des particules ayant un diamètre inférieur à 5  $\mu\text{m}$  (microparticules) (Turon et al., 1997).

Les éponges peuvent ainsi bioaccumuler des polluants dissous dans l'eau ou adsorbés sur les sédiments (Müller et al., 1998).

Les éponges servent d'abris à des espèces commensales qui profitent des apports en nourriture que leur fournit l'éponge hôte (crevettes du genre *Euplectella*, larves de certains

insectes Névroptères qui s'abritent dans certains *Spongillidae*). Il peut aussi exister des relations symbiotiques. C'est le cas pour *S. domuncula* qui peut se fixer sur un coquillage abritant un crabe *Pagurites osculatus* (Bernard l'hermite) ; ce dernier se trouve ainsi protégé par l'éponge qui, elle, profite des débris alimentaires et reliefs de repas du crustacé. Certaines éponges peuvent s'associer à des algues unicellulaires (comme la chlorelle), sans que cette association prenne un caractère obligatoire (Vacelet et Donadey, 1977). Les éponges sont aussi les seuls animaux connus vivant en symbiose avec des cyanobactéries (Brusca et Brusca, 2003 ; Thacker et Starnes, 2003). Toutes les éponges marines vivent, en revanche, en symbiose avec des bactéries du genre *Pseudomonas* ou *Aeromonas* qui représentent 40-60% de leur « biomasse » (Wilkinson, 1978 ; Böhm et al., 2001 ; Hentschel et al., 2003). Cette symbiose présente un intérêt en terme de capture de nutriments (Wilkinson et Garrone, 1980), dans la constitution de réserves en relation avec la photosynthèse (si la symbiose se fait avec des symbionts photoautotrophes) (Steindler et al., 2002 ; Wilkinson, 1983) et dans la production de métabolites secondaires (Schmidt et al., 2000).

Les éponges constituent une source importante de métabolites secondaires (Faulknet, 2000 ; Sarma et al., 1993) dont certains sont produits par les bactéries elles-mêmes (Haygood et al., 1999 ; Hill, 2004). Ces métabolites secondaires constituent un moyen chimique de défense contre la prédation, la fixation de microorganismes ou d'invertébrés sur l'éponge (Pawlik et al., 1995 ; Kubanek et al., 2002). Représentant une source de protéines, les éponges sont les proies d'organismes marins (tortues, certains poissons, nudibranches, étoiles de mer et oursins – Torres et al., 2002). Certains extraits de l'éponge ont une activité anti-microbienne et cytostatique (Müller et al., 2004). Leurs propriétés pharmacologiques font de ces animaux des espèces d'intérêt en biotechnologie ; l'usage de certaines molécules en thérapie humaine est actuellement envisagé (Müller et al., 2009).

Ces organismes présentent aussi un intérêt en tant que bioindicateurs de la qualité du milieu, du fait de :

- leur présence dans toutes les mers du globe, à différentes profondeurs,
- leur capacité à capter des composés, donc à bioaccumuler les polluants du milieu marin,
- leur niveau d'organisation simple, qui facilite l'identification des composés bioaccumulés, leur devenir et l'analyse de la réponse biologique à un ou à des stress,
- leur durée de vie longue (jusqu'à 15000 ans) (Dayton et al., 1970).

En 1985, Patel et al. proposent d'utiliser l'éponge comme bioindicateur de pollution dans un programme dont l'intitulé est "Sponge Watch", en complément du "Mussel Watch" déjà existant.

Quelques publications font depuis lors état de l'utilisation de ces animaux comme bioindicateurs de pollution par des métaux lourds (Patel, 1985; Batel et al., 1993; Schröder et al., 1999; Webster et al., 2001; Rao et al., 2006; Cebrian et al., 2007 a,b; Venkateswara Rao et al., 2008). L'effet des HAPs, du TBT, a également été étudié sur ces organismes (Batel et al., 1993 ; Negri et al., 2006 ; Zahn et al., 1981; Kurelec et al., 1987).

D'autres études ont porté sur l'activation de p38 et JNK, dont les gènes ont été clonés chez *S. domuncula* (Böhm et al., 2000 ; 2002), en réponse aux lipopolysaccharides bactériens, à un stress UV (Böhm et al., 2000), à un choc hyperosmotique (Böhm et al., 2001).

En outre, en réponse aux PCB (Biphényl polychlorés), au cadmium (Schröder et al., 1999), au TBT (Batel et al., 1993), à des variations de température, de pH, à un stress osmotique (Koziol et al., 1996), une augmentation de l'expression des Hsp70 a été observée.

Au laboratoire de l'université de Mainz, l'éponge *S. domuncula* (Fig. 4) est le modèle cible pour des études toxicologiques. La taille de cet invertébré peut varier de 10 à 40 cm de longueur. Sa surface est lisse et sa couleur est généralement orange. *S. domuncula* vit en symbiose avec le crabe *Pagurus osculatus* qui se loge dans une coquille qu'elle recouvre. L'éponge tire intérêt de cette symbiose par le fait qu'elle peut ainsi se déplacer. Il s'agit d'une espèce particulièrement abondante dans la zone de Rovinj (Croatie).



**Fig.4.** *Suberites domuncula* en symbiose avec le crabe *Pagurites osculatus*

Dans le cadre de cette étude, utilisant *S. domuncula* comme modèle expérimental, nous nous proposons d'étudier l'induction de protéines de la signalisation intracellulaire en réponse à deux types de polluants, le TBT et les HAPs.

Il s'agit *i)* dans un premier temps, de développer un test ELISA pour mesurer de l'activation des MAP kinases p38, JNK et ERK, *ii)* puis d'appliquer ce test afin d'évaluer l'effet du TBT et des HAPs sur l'induction de ces MAPKs. Il s'agit aussi d'étudier l'une des réponses de la cellule à l'induction de ces MAPKs, l'apoptose.

## II. Résultats

### 1. Développement d'un test ELISA pour la mesure de MAP kinases

Pour la mise au point de ce test, les éponges sont stimulées par des lipopolysaccharides (LPS), extraits de la paroi d'*Escherichia coli*, bactérie gram-négatif (Ulevitch et Tobias, 1994). Le LPS est connu pour activer p38 et JNK chez l'éponge (Böhm et al., 2001).

#### 1.1. P38

Les résultats que nous avons obtenus sont décrits dans l'article (Müller W.E.G., Custódio M.R., Wiens M., Zilberberg C., **Châtel A.**, Müller I.M., Schröder H.C. (2009) *Stem cell pattern in Porifera : Effect of bacterial infection*) (annexe 1).

Brièvement, après incubation des éponges en présence de 10 µg/ml de LPS, pendant des périodes allant de 5 min à 24 h, l'activation de la p38, mesurée par la technique ELISA utilisant un anticorps commercial polyclonal de lapin dirigé contre la p38 et dont la spécificité a été préalablement vérifiée par Western blot (Hamer et al., 2008), et un anticorps polyclonal de lapin anti-p38 d'éponge, produit au laboratoire de l'université de Mainz, comme contrôle positif, nous constatons après plusieurs essais :

- une fixation optimale des protéines sur la plaque ELISA, pour une concentration en protéines de 20 µg pour 50 µL de PBS, après 3 h d'incubation à température ambiante,
- que 10 µg de LPS par mL de PBS sont suffisants pour une activation de p38,
- une activation maximale de p38 après 1 h d'exposition au LPS.

#### 1.2. JNK et ERK

Les résultats obtenus ont été présentés oralement lors de colloques **Châtel A. et al.**, 2008 – *Marseille, Rovinj (Croatie) et Bruxelles (Belgique)* et par poster **Châtel A., et al.**, 2008 – *Barcelone (Espagne) et Leipzig (Allemagne)*.

L'activation de JNK et de ERK, en réponse au LPS, est étudiée en utilisant des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées et totales de JNK et de ERK. La spécificité des anticorps dirigés contre JNK a été testée avant notre étude par Böhm et al. (2000). Nous avons vérifié celle des anticorps anti-ERKs par Western blot (Fig. 5).

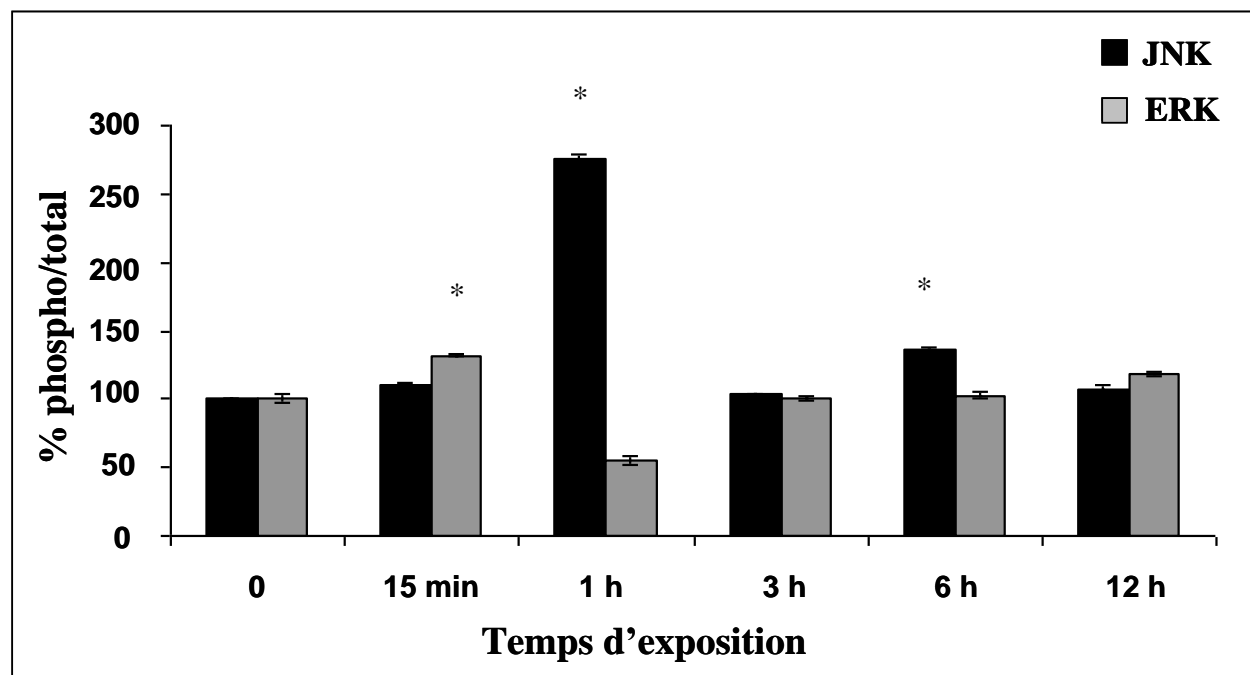


**Fig. 5. Spécificité des anticorps anti-ERK et anti-pERK contrôlée par Western blot sur des extraits protéiques d'éponge.**

Les anticorps reconnaissent bien chez l'éponge les 2 formes, activées ou non, de ERK, ERK1 (44 KDa) et ERK2 (42 KDa).

Après traitement des éponges, nos résultats montrent un maximum d'activation de JNK après 1h d'exposition à une concentration de 10 µg/mL de LPS.

L'activation de ERK, dans les mêmes conditions expérimentales, est plus rapide puisqu'un pic d'activation est observé après 15 min d'incubation (Fig.6).



**Fig. 6. Activation de JNK et ERK après exposition des éponges à 10 µg/mL de LPS (n=6, \* valeurs statistiquement différentes du témoin)**

## 2. Effet de polluants du milieu marin sur la voie des MAPKs

Notre étude a pour objectif d'étudier les effets du tributylétain et des hydrocarbures sur les voies de signalisation intracellulaire des MAPKs de l'éponge, en utilisant l'eau oxygénée comme témoin positif.

Ces résultats font l'objet d'un article (*Châtel A. and Talarmin H., Hamer B., Schröder, H.C., Müller W.E.G., Dorange G. Apoptosis in the sponge Suberites domuncula exposed to pollutants*) soumis pour publication dans Aquatic toxicology (Annexe 2).

## Etude de la prolifération cellulaire



Les essais étant réalisés sur des fragments d'éponge, il était important de vérifier si le stress mécanique dû à la dissection induisait une prolifération cellulaire et si la voie de signalisation intracellulaire ERK était de ce fait activée chez l'éponge.

Dans ce but, nous nous sommes intéressés à la cycline D1, car elle est régulée par ERK et qu'elle est impliquée dans la progression des cellules en phase G1 du cycle cellulaire en association avec des CDKs (cyclines dépendantes des kinases).

Les résultats montrent une induction de l'expression de la cycline D1 maximale à 24 h dans les fragments d'éponge témoins, non exposés à des polluants. Nous notons également à  $t=0$ , un taux basal de cycline D1, qui doit s'expliquer par un asynchronisme dans la division cellulaire.

Pour les échantillons exposés à de fortes concentrations en  $H_2O_2$  et TBT, la cycline D1 diminue, ce qui indique que la prolifération cellulaire est ralentie. En revanche, pour les HAPs, cette expression n'est pas diminuée.

## **$H_2O_2$**

$H_2O_2$  est un agent génotoxique connu pour activer les MAP kinases (Singh et al., 1988; Visvardis et al., 1997). L'ensemble de nos résultats permet de démontrer qu'une exposition des éponges à des concentrations de  $H_2O_2$  variant de 0,222 à 2 mmol/L induit une activation significative de p38 et de ERK. Les mesures sont faites par technique ELISA.

En outre, par la technique du Fast micromethod<sup>®</sup>, des cassures simple brin sont détectées (Müller et al., 1997). Le nombre de cassures est dose-dépendant après 1h d'exposition à des concentrations de 0,666 et 2 mmol/L de  $H_2O_2$ , puis il diminue après 6h et 24h de stabulation dans de l'eau de mer.

La méthode TUNEL, qui permet d'identifier des cassures double brin dues à l'apoptose, révèle une forte réactivité des coupes d'éponge traitées par 2 mmol/L de  $H_2O_2$ . L'induction de l'apoptose est confirmée pour toutes les concentrations de  $H_2O_2$ , par l'activité caspase 3, maximale pour une concentration de 2 mmol/L.

## **TBT**

Les résultats de l'exposition au TBT montrent que des concentrations variant de 33 à 300  $\mu\text{g/L}$  induisent une forte activation de p38 et de JNK, même après 24 h de maintien dans l'eau de mer. En revanche, ce composé n'active pas ERK.

Une fragmentation de l'ADN est observée pour les doses de 33 et 100 µg/L de TBT. Toutefois, pour une concentration de 33 µg/L, elle est détectée dès 6 h alors que pour 100 µg/L, elle n'apparaît qu'après 24 h.

La technique du TUNEL montre une forte fluorescence des coupes d'éponge mises en contact de 33 µg/L de TBT pendant 1 h, permettant de conclure à de l'apoptose. Cette donnée est confirmée par la présence d'une activité caspase 3 que l'on observe d'ailleurs pour toutes les concentrations étudiées.

### **HAPs**

Après l'exposition des échantillons d'éponge pendant 1 h aux HAPs, à des concentrations variant de 3,25 à 30%, les données montrent :

- une activation de p38 et de ERK, et de façon moindre de JNK. Toutefois, ERK n'est activée que pour des concentrations de 3,25 et 7,5%,
- des cassures de l'ADN pour les doses de 3,25 et 7,5 % après 1h d'exposition, avec une réduction des dommages après 6h et 24h de récupération dans de l'eau de mer. Une diminution de l'intégrité de l'ADN est également observée pour les concentrations de 15 et 30 %,
- une fluorescence nette, par la technique TUNEL, de certaines cellules d'éponge exposée à une dose de 7,5% pendant 1 h,
- une faible induction de la caspase 3, comparativement aux résultats obtenus pour les autres substances testées.

### III. Discussion / Conclusion

#### 1. Mise en place du test ELISA – Précautions

Le test ELISA, mis en place en préliminaire des essais toxicologiques chez l'éponge, est reproductible et sensible pour détecter des changements dans la phosphorylation des MAP kinases.

Un certain nombre de précautions ont été prises en vue de valider l'intérêt de ce test :

- La spécificité des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées et totales de chaque protéine a été vérifiée par Western blot;
- La mise au point du test chez l'éponge a été réalisée en stimulant les MAPKs étudiées par des lipopolysaccharides bactériens (LPS), dont les effets avaient déjà été évalués chez cet invertébré marin par Western blot (Böhm et al., 2001 ; Hamer et al., 2008).

L'induction de la p38 observée après 1 h d'exposition au LPS est conforme aux données de la littérature qu'il s'agisse de tests réalisés sur des fragments d'éponge (Böhm et al., 2001) ou menés *in vitro* sur des « primmorphs » en culture exposés au LPS (Schröder et al., 2003) ou à un mélange LPS/acide okadaïque, biotoxine algale (Wiens et al., 2003).

Concernant JNK et ERK :

- Un pic de pJNK est noté après 1 h d'exposition au LPS, ce qui est conforme aux observations de Böhm et al. (2000) ;
- ERK est légèrement activée après 15 minutes d'exposition mais les taux diminuent ensuite pour rester à un niveau basal. Nakayama et al. (2002) montrent, dans des cellules dendritiques, une activation de ERK après 5 minutes d'exposition au LPS, à la concentration de 1 µg/mL, et un retour au niveau basal après 15 min. Il est donc vraisemblable qu'à 15 min, nous ne détectons plus d'activation, la mesure étant un peu trop tardive.

Ces résultats confirmant l'intérêt du protocole ELISA sur l'éponge, nous l'avons appliqué à l'étude de l'activation des MAP kinases en réponse au TBT et aux HAPs.

## 2. Application du test ELISA pour les essais toxicologiques

### Préliminaires

Des précautions ont été également prises pour ces essais toxicologiques :

- L'eau oxygénée a été choisie comme « témoin positif » car son effet inducteur des MAPKs est démontré (Zroui et al., 2004). De plus, il s'agit d'un composé génotoxique connu (Singh et al., 1988 ; Kruszewski et al., 1994),
- En outre, la dissection de l'éponge en fragments, pouvant être à l'origine, par stress mécanique, d'une prolifération cellulaire, donc d'une activation de ERK dont le rôle dans le contrôle du cycle cellulaire est bien connu (chez les Mammifères), nous avons analysé le taux d'expression de la cycline D1 pour éliminer de faux résultats positifs après exposition des échantillons aux xénobiotiques étudiés. Les cellules de l'éponge sont en effet capables de proliférer pour restaurer l'intégrité de l'organisme en cas de lésions. Ceci a été démontré par une forte activité télomérasique dans la plupart des cellules de Métazoaires dont l'éponge (Koziol et al., 1998). Parmi les acteurs impliqués dans le cycle cellulaire, les cyclines D, unités régulatrices des kinases dépendantes de cyclines (CDK) 4 et 6, contrôlent la transition des cellules en phase S, phase de duplication de l'ADN. De plus, la MAPK ERK est nécessaire dans de nombreux types cellulaires pour passer le point de restriction en G1/S (Pages et al., 1993), d'où l'hypothèse d'un lien entre les cyclines D et ERK, démontré chez les Mammifères. Une inhibition de MEK ou de ERK empêche l'expression de la cycline D1 (Lavoie et al., 1996). Nos résultats montrent qu'après 6h et 24h d'incubation dans de l'eau de mer, sans exposition préalable à un agent chimique, la synthèse de la cycline D1 dans les fragments d'éponge est effectivement induite, et que par conséquent, les mécanismes de division cellulaire se mettent en place.

La dissection des éponges en fragments pourraient donc fausser les résultats concernant ERK par les différents agents chimiques testés. Cette information doit donc être prise en compte lors de l'interprétation des données des essais toxicologiques.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L'eau oxygénée, connue pour induire l'activation de MAPKs (Zroui et al., 2004), provoque chez l'éponge, une augmentation de pp38 et de pERK à un niveau supérieur à celui observé pour les témoins, conformément à ce qui a été constaté dans le manteau de moule *M. galloprovincialis* par Gaitanaki et al. (2003), dans des cellules d'amphibien par Carter et al.

(2002) et dans des cardiomyocytes de rat par Tu et al. (2003). Une faible activation de JNK a également pu être notée mais seulement pour une concentration de 0,222 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il est vraisemblable, comme l'indiquent Masuda et al. (2003), que l'activation de ERK puisse induire la phosphorylation d'une phosphatase, la MAPK phosphatase 7 (MKP-7) qui inactive préférentiellement JNK. En outre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut, à fortes doses, induire l'activation des Hsp70, qui inhibent en retour JNK (Park et Liu, 2001).

Les MAPKs, induisant des réponses cellulaires allant de l'apoptose à la différenciation et la prolifération cellulaire, nous avons souhaité analyser leur rôle dans les conditions expérimentales choisies et nous nous sommes intéressés à l'apoptose.

La technique du Fast micromethod<sup>®</sup>, permettant de mesurer les cassures simple brin de l'ADN, les sites labile alcalins et la réparation par excision des nucléotides (Jaksic et Batel, 2003), est estimée comme une méthode rapide et sensible lorsqu'elle est appliquée aux invertébrés marins. Tel est le cas pour la moule *M. edulis* ou l'huître *Crassostrea virginica*, exposées à des biphénols polychlorés, des HAPs (Nacci et al., 1992) ou à des métaux lourds (Efremova et al., 2002). En 2003, Jaksic et Batel ont montré que cette technique pouvait être utilisée dans les programmes de biosurveillance afin d'évaluer la génotoxicité d'agents physiques ou chimiques sur les organismes marins. Ils ont montré un taux de cassure de l'ADN dose-dépendant chez *M. galloprovincialis* et *S. domuncula* après exposition aux rayons  $\gamma$ , à la bléomycine, au benzo(a)pyrène et au *N*-oxide 4-nitroquinoline.

L'eau oxygénée est connue pour induire des modifications des bases de l'ADN, selon la réaction de Fenton, suite à la formation de radicaux hydroxyl (OH<sup>-</sup>) hautement réactifs (von Sonntag, 1987 ; Halliwell and Aruoma, 1991). Il ne provoque pas de coupure directe de l'ADN. Nos résultats montrent une induction de la fragmentation de l'ADN pour toutes les doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le plus fort taux de fragmentation est observé 1h après exposition des éponges à 2 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avec un retour à un niveau basal après 6h et 24h de récupération dans de l'eau de mer. Pour expliquer ce résultat, 2 hypothèses peuvent être formulées : *i*) une capacité des cellules à réparer les lésions de l'ADN ou *ii*) une induction de l'apoptose éliminant les cellules dont l'ADN est trop altéré pour être réparé. Les analyses par méthode TUNEL et l'étude de l'activité caspase nous permettent de conclure à un processus apoptotique.

La cinétique d'activation de la caspase 3 suit le même profil que celui de ERK pour de fortes concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zhuang et al. (2000) ont démontré que le traitement d'une lignée

humaine HL-60 par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoquait une activation rapide de p38 sans affecter les taux de JNK mais ils ont aussi montré que p38 n'était pas responsable de l'apoptose médiée par la caspase 3. Ceci suggère donc pour l'éponge, une activation de la caspase 3 par ERK.

Liu et al. (1997) ont identifié un facteur de fragmentation de l'ADN (DFF), composé de DFF40 et 45, actif lorsque la caspase 3 est elle-même activée. Chez l'éponge, après induction du processus apoptotique, DFF45 peut être clivé par la caspase 3 et se dissocier de DFF40 (Liu et al., 1997 ; Nagata, 2000). Le DFF40 libre clive alors l'ADN en fragments nucléosomiques dont la taille est multiple de 180-200 pb, ce qui est caractéristique de l'apoptose (Zhang et Xu, 2000).

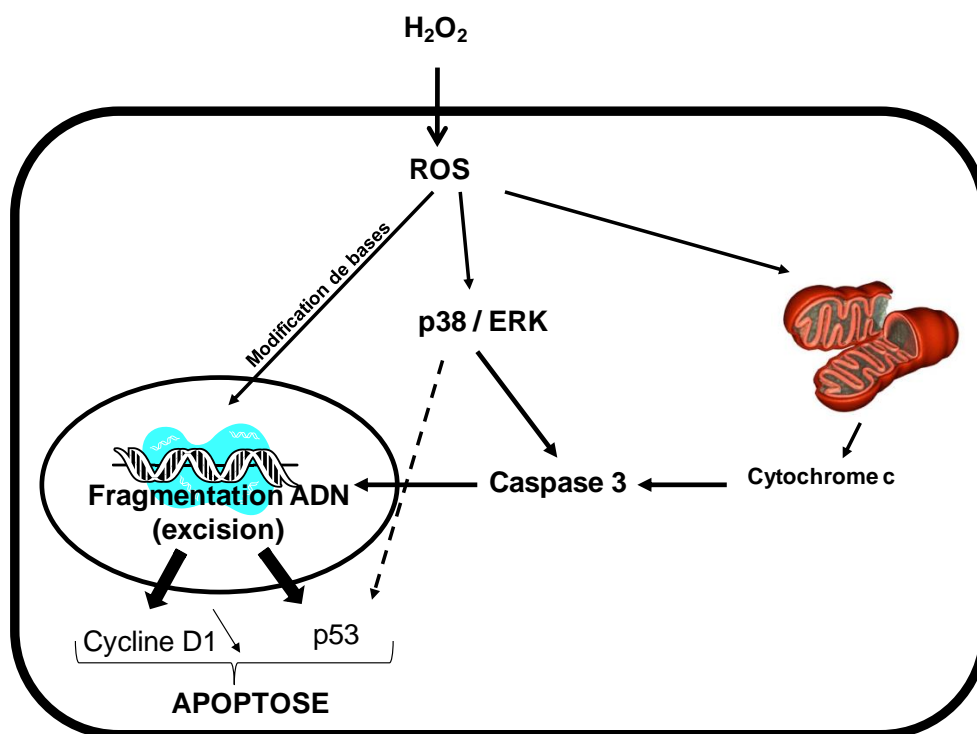
De plus, une baisse de l'expression de la cycline D1, donc une diminution de la prolifération cellulaire, est constatée pour les éponges traitées par une forte dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2 mmol/L, laissant place à de l'apoptose, conformément à ce qui a été observé par Barnouin et al. (2002) pour des fibroblastes de souris exposées à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les mêmes conditions. Ces auteurs constatent en effet une diminution de l'expression des cyclines D, donc une baisse de l'activité CDK4/cycline D, entraînant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre dans les cellules par processus actif, *via* des perméases. Les radicaux libres (ROS) ont deux cibles, les acides gras polyinsaturés principalement (Halliwell et Gutteridge, 1992) et l'ADN. Il s'en suit une perméabilisation des biomembranes dont celles des mitochondries, une modification du potentiel de membrane, accompagnée d'une surproduction de ROS (Kuhn et Borchert, 2002).

Chez l'éponge, le traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne l'activation de p38 et de JNK et celle de la caspase 3, ainsi que la fragmentation de l'ADN, aboutissant à de l'apoptose (Fig. 4). Les MAPKs sont connues pour phosphoryler p53 (Bulavin et al., 1999 ; Huang et al., 1999). Dans certaines cellules, l'activation de p53 induit l'apoptose (Choi et al., 2000 ; Lee et al., 2000), alors que dans d'autres, il s'agit d'une protection des cellules par arrêt de la progression du cycle cellulaire et déclenchement des mécanismes de réparation (Ko et Prives, 1996 ; Giaccia et Kastan, 1998 ; Prives et Hall, 1999). Un homologue du gène codant pour p53 a récemment été cloné chez *Mytilus* (Banni et al., 2009). En outre, gadd45, impliqué dans la réparation de l'ADN, a été identifié comme étant l'un des gènes régulé par p53 (Smith et al., 2000). P53 est connue comme étant impliquée dans la réparation par excision d'adduits de l'ADN (NER : Nucleotide Excision Repair) et de bases nucléotidiques (BER : Base Excision Repair) (Seo et

Jung, 2004). Chez l'éponge, cette protéine pourrait également intervenir dans les processus de réparation de l'ADN par excision.

L'ensemble des données obtenues au cours de ce travail permet de proposer un mécanisme d'action de l'eau oxygénée chez l'éponge résumé sur la figure 7.



**Fig. 7. Schéma d'induction de l'apoptose par  $H_2O_2$  chez l'éponge *S. domuncula***

## TBT

Concernant le TBT, composé organométallique franchissant passivement la membrane plasmique, les cellules d'éponge répondent à une exposition par l'activation de p38 et de JNK. Cet effet est encore observé après 6 h et 24 h hors présence du polluant. L'hypothèse de Gaitanaki et al. (2004) chez la moule *M. galloprovincialis*, selon laquelle les substrats de p38 sont localisés dans le cytoplasme plutôt que dans le noyau peut expliquer que les MAPKs soient réactivées par leurs substrats (Kyriakis et Avruch, 1996 a,b), et par voie de conséquence, le maintien des formes phosphorylées observées chez l'éponge. Aucun effet n'est en revanche constaté pour ERK. C'est aussi le constat de Damiani et al. (2009) chez des ascidies pour des concentrations proches de celles utilisées dans cette étude alors que de fortes concentrations (jusqu'à 10  $\mu M$ ) de TBT entraînaient une diminution importante de pERK.

Le TBT est connu comme agent génotoxique puisqu'il est à l'origine d'une hypométhylation des bases nucléotidiques, processus influant sur l'expression des gènes (Wang et al., 2009).

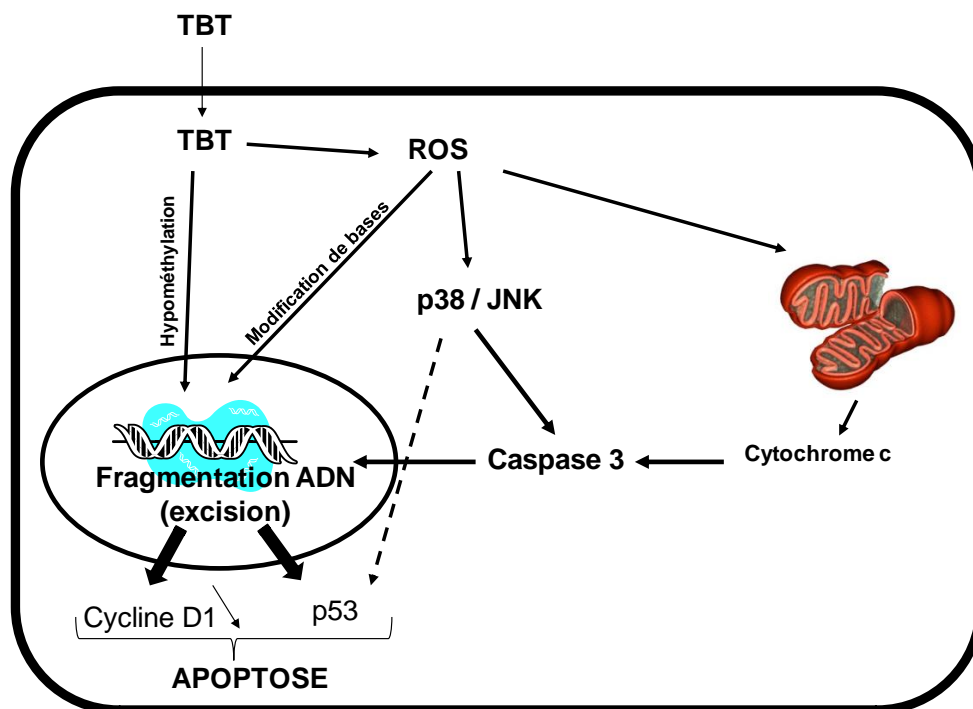
De plus, ce composé induit la formation de radicaux libres, qui modifient les bases (Von Sonntag, 1987). Nos résultats montrent des coupures de l'ADN, détectées par le Fast micromethod<sup>®</sup> pour les doses de 33 et 100 µg/L de TBT. Par ce même test et pour le même composé, Batel et al. (1993) ont aussi noté chez l'éponge *G. cydonium*, des lésions de l'ADN, accompagnées de l'induction des Hsp70. Puis, Fafandel et al. en 2003 rapportent une activation de la protéine kinase, impliquée dans la médiation de l'apoptose, suite à ce même type de stress (Krs kinase).

Au cours de cette étude, nous détectons une activité caspase pour toutes les doses de TBT testées et une positivité par la méthode « TUNEL », ce qui est caractéristique de l'apoptose.

Conformément aux conclusions de Owuor et Kong (2002), qui constatent une corrélation entre l'activation de JNK et celle de la caspase 3 dans des cellules de truite exposées au TBT, il semble que nous puissions formuler l'hypothèse d'une induction de l'apoptose médiée par la caspase 3 et dépendante de JNK. De plus, nous notons pour les fortes concentrations de TBT, comme pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une baisse de l'expression de la cycline D1, signifiant donc un arrêt dans la progression du cycle cellulaire. Ceci est en accord avec les résultats de Micic et al. (2001) qui observent chez la moule une diminution du nombre de cellules en transition G2/M du cycle cellulaire. Au cours de la phase G2, période précédant la mitose, la cellule peut réparer l'ADN (Hartwell, 1992).

Pour le TBT, l'ensemble de nos données permet de proposer pour l'éponge le schéma « mécanistique » de la figure 8.





**Fig. 8. Mécanisme induisant l'apoptose proposé pour le TBT chez l'éponge *S. domuncula***

## HAPs

Pour les HAPs, molécules lipophiles qui entrent également passivement dans les cellules, nous avons noté une activation de p38 et de ERK, et plus faiblement de JNK.

Dans les hépatomes humains, le benzo(a)pyrène, l'un des HAPs, affecte la phosphorylation de p38 et de ERK 1/2 (Chen et al., 2003). Il en est de même pour JNK chez la souris (Lei et al., 1998), alors que les isomères de l'anthracène ont des effets opposés sur ERK1/2, selon leur structure (Rummel et al., 1999).

Les HAPs sont métabolisées par le système cytochrome P450 et monooxygénases dépendantes. Des métabolites hautement réactifs sont formés, qui sont à l'origine d'adduits de l'ADN (Pelkonen et Nebert, 1982) et de radicaux libres.

Pour une faible concentration de HAPs (3,25%), nous observons une augmentation des cassures simple brin. Cette altération de l'ADN est la conséquence d'un phénomène de réparation des cellules, excisant les adduits, sans induction de l'apoptose puisque aucune activité caspase 3 n'est détectée. Le gène impliqué dans la réparation par excision (XPB/ERCC-3) a été séquencé chez l'éponge *G. cydonium* (Batel et al., 1998). Chez l'Homme, ce gène code pour une hélicase, qui déroule l'ADN pour permettre l'excision des adduits (Sancar, 1996).

A faible dose, nous avons également noté une activation de ERK, dont le rôle anti-apoptotique a été largement décrit dans de nombreux types cellulaires (Luchetti et al., 2009). En revanche, aux autres concentrations, nous observons moins de dommages de l'ADN, mais une induction de l'activité de la caspase 3 et la présence de cellules apoptotiques détectées par la technique TUNEL. Il est vraisemblable que dans ces conditions, le taux d'adduits de l'ADN soit très important et que les cellules dont l'ADN est trop altéré soient éliminées par apoptose, conformément à l'hypothèse de Rummel et al. (1999). Ces auteurs émettent l'hypothèse que le benzo(a)pyrène induit l'apoptose *via* l'activation de la caspase 3, indépendamment de l'activation de JNK.

L'ensemble des données obtenues chez l'éponge exposée aux HAPs suggère la mise en œuvre des mécanismes proposés dans la figure 9.

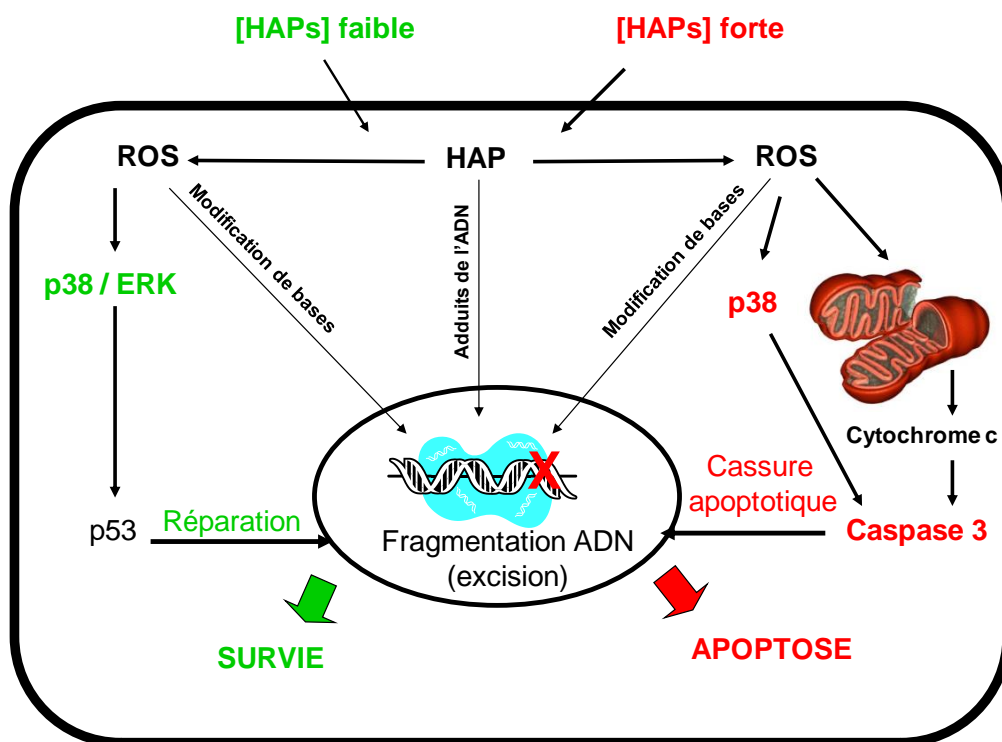


Fig. 9. Schéma d'induction des voies de signalisation par les HAPs, à faible et forte concentration chez l'éponge *S. domuncula*

#### En conclusion :

- Cette étude a permis de mettre au point un test ELISA permettant d'évaluer l'activation des MAP kinases. L'utilisation de cette technique, rapide et spécifique, pourra être envisagée pour d'autres études toxicologiques.
- L'analyse par ce test de l'effet du TBT et des HAPs a mis en évidence, chez l'éponge, une activation différentielle des MAPKs pour toutes les concentrations utilisées.
- L'exposition au TBT et à de fortes concentrations de HAPs déclenchent l'apoptose en impliquant la caspase 3.

## CHAPITRE 2

La moule *Mytilus galloprovincialis*  
comme modèle d'étude

## I. Introduction



*Mytilus galloprovincialis* (Fig. 1) est un mollusque bivalve, de la famille des Mytilidés, qui vit communément en mer Méditerranée, en Adriatique, en mer Noire, mais également le long des côtes Atlantique de France, de Grande Bretagne et d'Irlande (Gosling, 2003).

Résistant aux courants, aux chocs des vagues et à l'arrachement grâce au byssus qui les soude entre elles et aux rochers, les moules sont présentes sur les côtes rocheuses, mais se trouvent également sur des sols sableux (Ceccherelli and Rossi, 1984), dans des endroits ouverts, avec un important renouvellement d'eau (Carlton, 1992).

**Fig. 1.** La moule *Mytilus galloprovincialis*

Du fait de leur croissance rapide, de leur tolérance à l'exposition à l'air et de leur taux de reproduction de 20 à 200 fois supérieur à celui des autres espèces de Mytilidés (Branch et Steffanni, 2004), elles peuvent devenir dominantes dans certaines zones du littoral.

Microphages omnivores, les moules se nourrissent de phytobenthos (diatomées), de phytoplancton mais aussi de débris organiques. Elles filtrent jusqu'à 100 L d'eau par jour, *via* les branchies, en opérant un tri sélectif des particules de 3 à 13  $\mu\text{m}$  de diamètre.

*M. galloprovincialis* a été et est très largement utilisée depuis les années 70 dans des programmes de surveillance du milieu marin (Phillips, 1976; 1977; Phillips et al., 1980; 1986 ; 1994 ; Philips et Segar, 1986; Cossa, 1989; Wolfe, 1991; Regoli et Orlando, 1993; Ka Imoussi et al., 2001; Kljakovic Gaspic et al., 2002), comme le programme américain «Mussel Watch» (Goldberg, 1975), les programmes européens MEDPOL (Gabrieldes, 1997) et BIOMAR (Narbonne et al., 1999), et plus récemment par exemple les programmes croates « Programmed biosynthesis and genotoxic risk assessment » (2006), « Ecotoxic effects of pollution on marine organisms » (2007 -2008), « Biomineralisation processes in marine organisms » (2007), « Impact of pollution on programmed biosynthesis in marine invertebrates » (2008), dont les données nous ont servi de support pour l'étude *in situ*.

Cette espèce est intéressante (Viarengo et al., 1991) du fait *i)* de sa répartition géographique (Whitfield, 2001), *ii)* du nombre suffisant d'animaux le long des côtes pour que

l'échantillonnage ne soit pas une menace pour les gisements, *iii*) de sa résistance à des niveaux élevés de pollution, *iv*) de son mode de vie sessile et de sa grande capacité de filtration de l'eau de mer, donc de bioaccumulation de xénobiotiques.

Malgré l'intérêt des *Mytilidae* pour la surveillance du milieu marin et le fait que les Invertébrés représentent 95% des espèces du règne animal, très peu de séquences codant pour des molécules impliquées dans la cascade de signalisation intracellulaire sont connues pour ces espèces (Gueguen et al., 2003; Shida et al., 2003; Venier et al., 2003; Kim et Ausubel, 2005).

Depuis quelques années, les protéines des voies de signalisation sont toutefois étudiées chez les mollusques gastéropodes et bivalves, en utilisant des anticorps et des inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre les protéines des Mammifères, ce qui rend compte du haut degré de conservation de ces molécules (Böhm et al., 2002; Müller et al., 2002; Graves et Krebs, 1999; Widman et al., 1999; Kyriakis et Avruch, 2001; Roux et Blenis, 2004).

Parmi les protéines de la cascade de signalisation intracellulaire étudiées plus particulièrement chez les moules, les MAP kinases jouent un rôle central. Leur activation a été démontrée, modulée par des contaminants de l'environnement, ceux appelés «Endocrine Disrupting Chemicals» (EDC) (Witorsch, 2002), tels que les biphenyl polychlorés (BPC) (Canesi et al., 2003), les oestrogènes synthétiques comme le diethylstilbestrol (Canesi et al., 2004 a, b, c), le bisphenol A (BPA) (Canesi et al., 2005) et le nonylphenol, les métaux lourds comme le cuivre (Burlando et al., 2006, Kefaloyianni et al., 2005), le zinc et le cadmium (Kefaloyianni et al., 2005 ; 2006).

D'autres études montrent le rôle des MAP kinases en réponse à des facteurs de croissance (Canesi et al., 2001), à une infection bactérienne (Canesi et al., 2002a,b,c ; 2005), à une exposition au peroxyde d'hydrogène (Gaitanaki et al., 2004) ou encore à des variations de température (Kefaloyianni et al., 2005).

Cependant, chez la moule, la cascade de signalisation conduisant à l'apoptose n'est pas bien connue. A notre connaissance, une seule étude montre une activation de la caspase 3 chez *M. galloprovincialis* en réponse à une exposition au  $\text{Cu}^{2+}$ , au  $\text{Zn}^{2+}$  et au  $\text{Cd}^{2+}$  (Kefaloyianni et al., 2005). Des travaux ont cependant porté sur l'induction de la fragmentation de l'ADN en réponse par exemple au TBT (Micic et al., 2001, 2002), au benzo(a)pyrène (Akcha et al., 2000, Bihari et al., 1990), à un mélange d'hydrocarbures (Perez-Cadahia et al., 2004) et à l'oxyde nitroquinoline (Bihari et al., 1990).

L'objectif de notre travail, utilisant la moule *M. galloprovincialis* comme modèle expérimental, est de caractériser, dans un premier temps, les gènes codant pour les MAP kinases JNK et ERK chez cette espèce, puis d'étudier l'activation de ces MAP kinases et l'induction de l'apoptose en réponse à deux types de polluants, le TBT et les HAPs, auxquels sont exposés les animaux en laboratoire. Il s'est agi de compléter ensuite ces études en réalisant les mêmes analyses à partir d'animaux prélevés en mer Adriatique, dans des sites de degré de pollution variable.

## II. Résultats

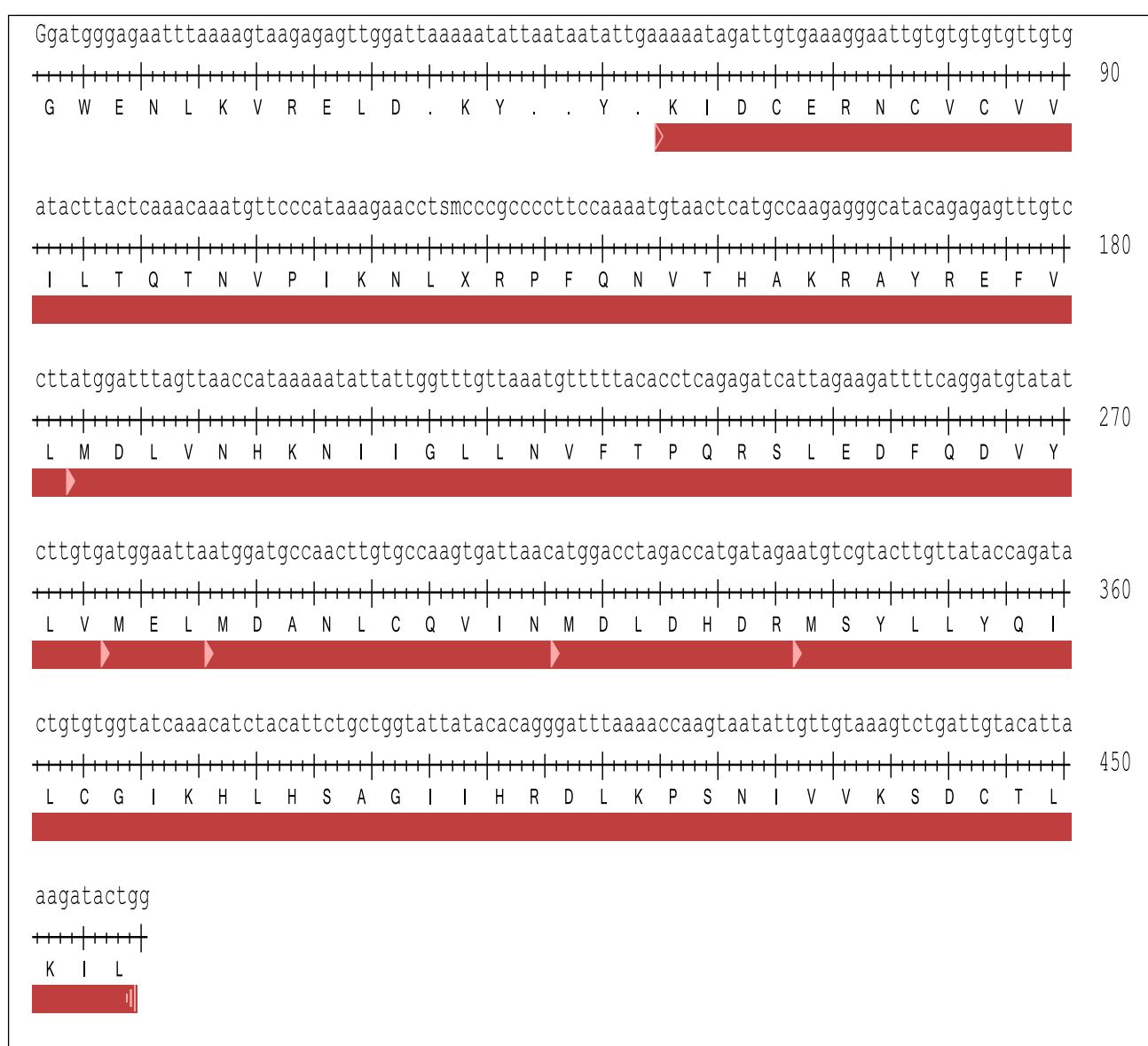
### 1. Etudes en laboratoire

- **Caractérisation des gènes JNK et ERK**

#### JNK

La séquence partielle JNK\_Myugal a été identifiée à partir d'une banque d'ADNc de *Mytilus galloprovincialis* à l'aide d'amorces dégénérées dirigées contre les domaines conservés de la séquence.

JNK\_Myugal consiste en 460 nucléotides (nt); la région codante (CDS : coding sequence) de 405 nt commence en position 55 et se termine en position 460 (référence NCBI : GQ454914) (Fig. 2).



**Fig. 2. Séquence de JNK\_Myugal en nucléotides, avec une correspondance en acides aminés. En rouge : la région codante (CDS).**



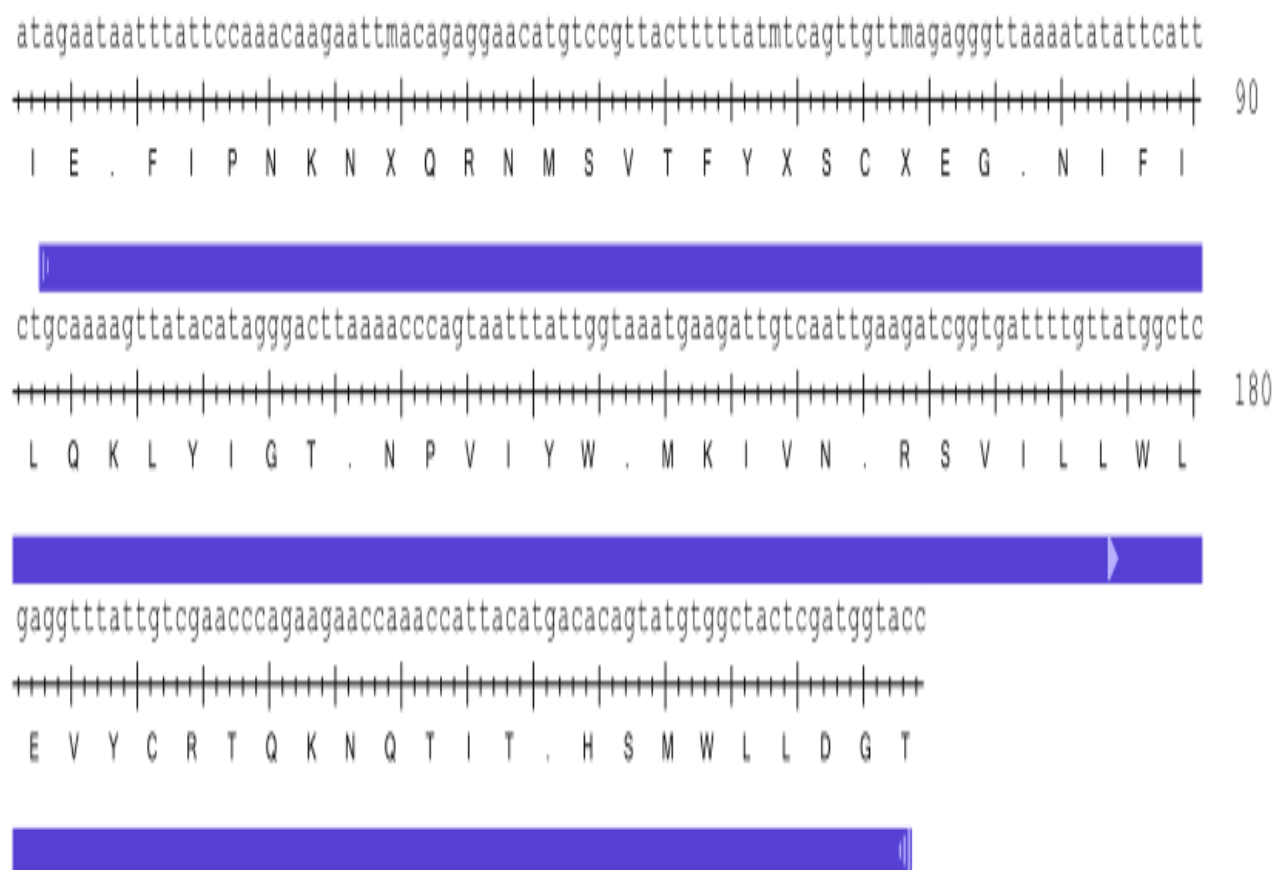
La séquence peptidique de 135 acides aminés, montre des homologues au niveau du domaine kinase avec celles du bivalve *Aplysia californica*\_JNK (AAP42290.1) (86%), de l'éponge *Suberites domuncula*\_JNK (Q966Y3.1) (73%) et des vertébrés *homo sapiens*\_MAPK8 (BAG70168.1) (82%) et *Mus musculus*\_MAPK8 (EDL24856.1) (82%). La séquence partielle contient les sites de phosphorylation ayant le motif TXY (Fig. 3).

</

**Fig. 3. Alignement de la séquence peptidique de JNK\_Mytgal avec celles de JNK homologues : *Aplysia californica*\_JNK (Aplysia, AAP42290.1), *Suberites domuncula*\_JNK (SUBDO, Q966Y3.1), l'*homo sapiens*\_MAPK8 (Homo, BAG70168.1) et *Mus musculus*\_MAPK8 (Mus, EDL24856.1). En noir : les résidus conservés. En encadré : les sites de phosphorylation (TXY) et souligné : le domaine protéine kinase.**

## ERK

La séquence partielle du gène ERK est obtenue (référence NCBI : GQ454915) à partir d'amorces dégénérées localisées sur des sites hautement conservés. Cette séquence est composée de 249 nucléotides dont 246 nucléotides correspondent à la partie codante (CDS, coding sequence), comme le montre la figure 4.



**Fig. 4. Séquence de ERK\_Mytgal en nucléotides et en acides aminés. En bleu : la région codante (CDS).**

La séquence partielle du peptide ERK est composé de 82 acides aminés et présente le domaine catalytique des protéines Serine/Threonine kinases.

La séquence ERK\_Mytgal (Fig. 5) possède une forte homologie de séquence avec celle des vertébrés *homo sapiens* et *Mus musculus*. Elle possède également un motif de phosphorylation TXY caractéristique des MAPKs, entouré par le domaine kinase très conservé au cours de l'évolution.



- **Effet du TBT et des HAPs sur l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases**

Ces résultats sont présentés dans l'article accepté pour publication dans *Aquatic toxicology* - **Châtel A., Hamer B., Talarmin H., Dorange G., Schröder, H.C., Müller W.E.G. (2009)** *Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution* (Annexe 3).

Pour les essais visant à exposer les moules en laboratoire, au TBT et aux HAPs, les animaux sont collectés dans une mariculture, à Rovinj (Croatie).

Certains lots de moule sont traités par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour disposer de témoins positifs. Nous avons évalué la phosphorylation/activation des MAPKs après 1h d'exposition aux agents chimiques, puis après 6h et 24h de récupération dans de l'eau de mer afin d'évaluer la capacité de l'animal à restaurer ses fonctions.

## **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Pour ce composé, connu pour activer les MAP kinases chez de nombreuses espèces et notamment chez la moule (Gaitanaki et al., 2004), les résultats suivants sont obtenus :

- une activation de p38 après 1h d'exposition à 0,074 et 0,222 mM d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ;
- une activation de ERK quelque soit le temps d'exposition et les concentrations testées ;
- une même cinétique d'activation pour p38 et ERK : activation à 1h, diminution de l'activation après 6h de récupération dans de l'eau de mer et réactivation après 24h ;
- une absence d'activation de JNK.

## **TBT**

Nos données montrent :

- une activation de p38 et de JNK après exposition des moules à 11, 33 et 100 µg/L de TBT, avec un niveau maximum observé après 6h de récupération dans de l'eau de mer, pour une concentration de 11µg/L ;
- une induction de p38 et JNK, non dose-dépendante ;
- une absence d'activation de ERK.

## HAPs

L'incubation des moules en présence de différentes concentrations de HAPs, permet d'observer :

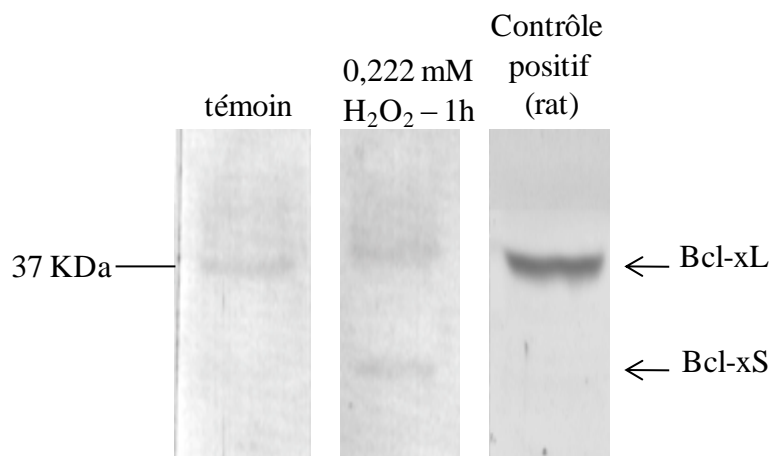
- une activation de p38 et de JNK mais pas de ERK ;
- une activation de p38 dose-dépendante après 1h d'exposition.

## • Etude de l'apoptose en réponse aux polluants

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

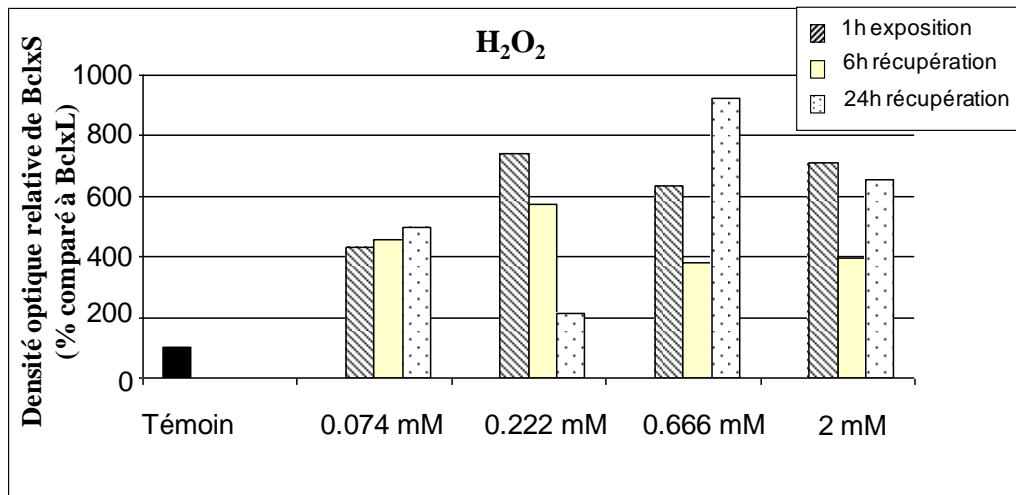
#### ➤ Expression de Bcl-xS

L'expression de Bcl-xS, protéine impliquée dans l'induction de l'apoptose médiée par voie mitochondriale, est étudiée par Western blot en utilisant un anticorps anti-humain Bcl-x qui reconnaît à la fois les formes Bcl-xS et Bcl-xL. Nos résultats montrent que, chez la moule *M. galloprovincialis*, Bcl-xL a un poids moléculaire de 37 KDa (*versus* 25-29 KDa chez les Mammifères - Lindenbouim et al., 2000) et que cette protéine est exprimée fortement. Par ailleurs, une bande additionnelle de 30 KDa pourrait correspondre à Bcl-xS, exprimée plus fortement dans des extraits de moule traitées avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que dans le lot témoin. Chez les Mammifères, cette bande a un poids moléculaire de 19,5 KDa (Fig. 6).



**Fig. 6. Expression de Bcl-xL/S dans des extraits protéiques de moules témoins et exposées à 0,222 mmol/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 1 h ; un extrait protéique de rat est utilisé comme témoin positif.**

Après traitement des moules dans les mêmes conditions que pour l'étude des MAPKs, les analyses montrent que le niveau d'expression de Bcl-xS est toujours supérieur à celui du témoin non traité. Pour une concentration de 0,222 mmol/L, nous observons une forte induction de l'expression de Bcl-xS à 1 h, suivie d'une récupération de l'animal après 6 h et 24 h dans de l'eau de mer, puisque l'expression de cette protéine diminue progressivement, sans pour autant revenir au niveau basal du témoin. Pour les doses de 0,666 et 2 mmol/L, une induction de l'expression est observée après 1 h d'exposition, puis une diminution à 6 h et une réactivation à 24 h (Fig. 7).

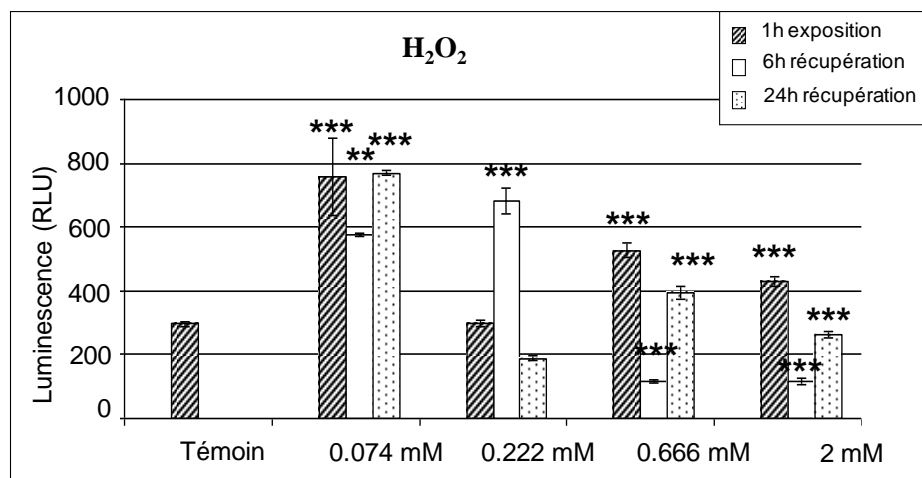


**Fig. 7. Expression de Bcl-xS (exprimé en % par rapport au taux de Bcl-xL) après exposition des moules à différentes concentrations d' $H_2O_2$ , analysée par Western blot (la quantification est réalisée à partir d'un seul blot)**

### ➤ *Activité de la caspase 3*

L'induction de cette enzyme est constatée après traitement par  $H_2O_2$ , pour toutes les concentrations testées mais pas pour tous les temps. Cette induction est forte après une exposition à 0,074 mmol/L pour les 3 temps testés, alors qu'une dose de 0,222 mmol/L n'induit l'activité de la caspase qu'à 6 h. Concernant les doses de 0,666 et 2 mmol/L, le maximum d'activité de la caspase 3 est observé à 1 h, suivi d'une diminution à 6 h et d'une réactivation après 24 h de récupération dans l'eau de mer. Nous pouvons cependant noter que pour ces doses, les taux d'activité sont plus faibles que pour les autres concentrations (Fig. 8).



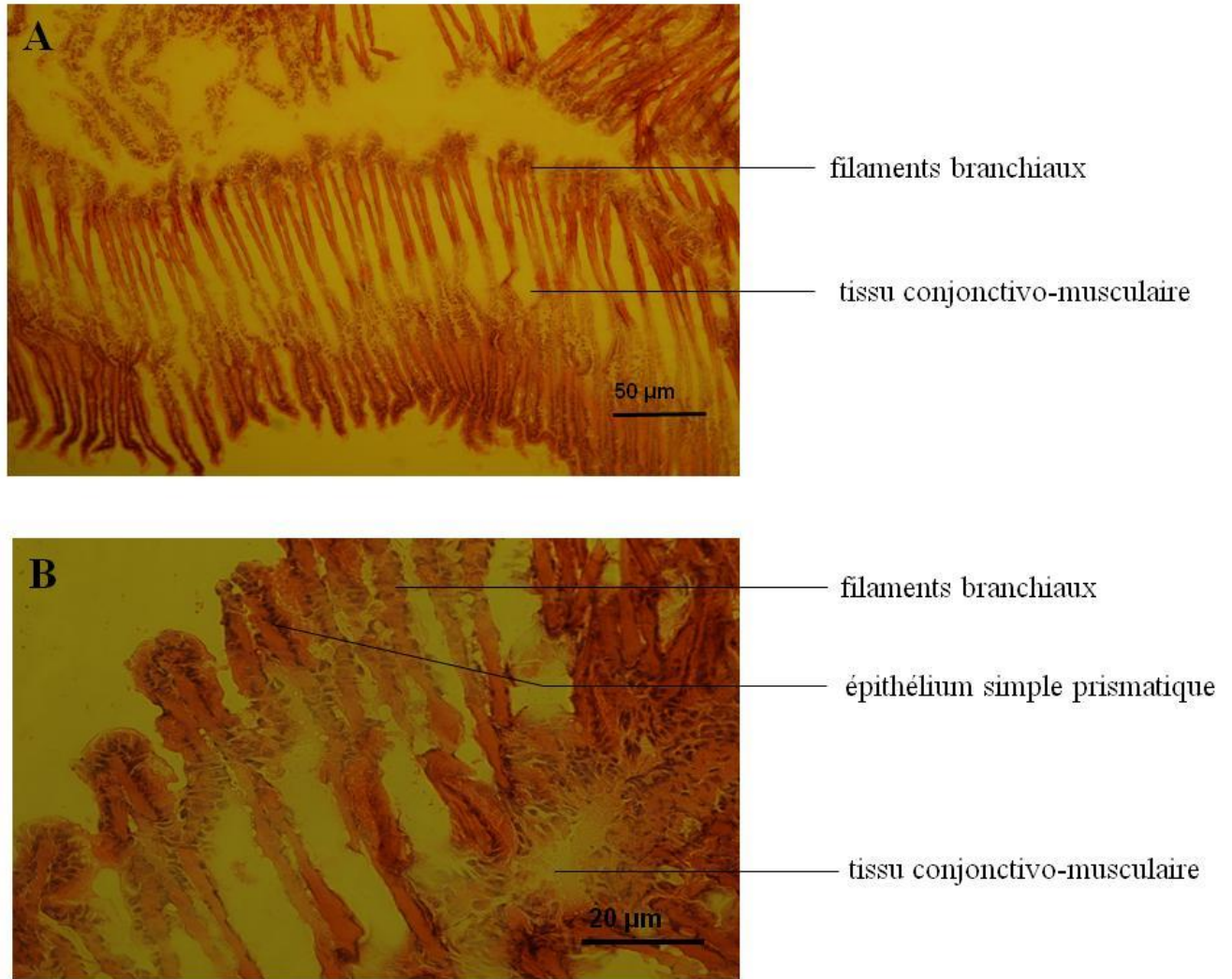


**Fig. 8. Activité de la caspase 3 chez la moule *M. galloprovincialis* exposée à différentes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en unité de luminescence) (n=4)**

#### ➤ *Intégrité de l'ADN*

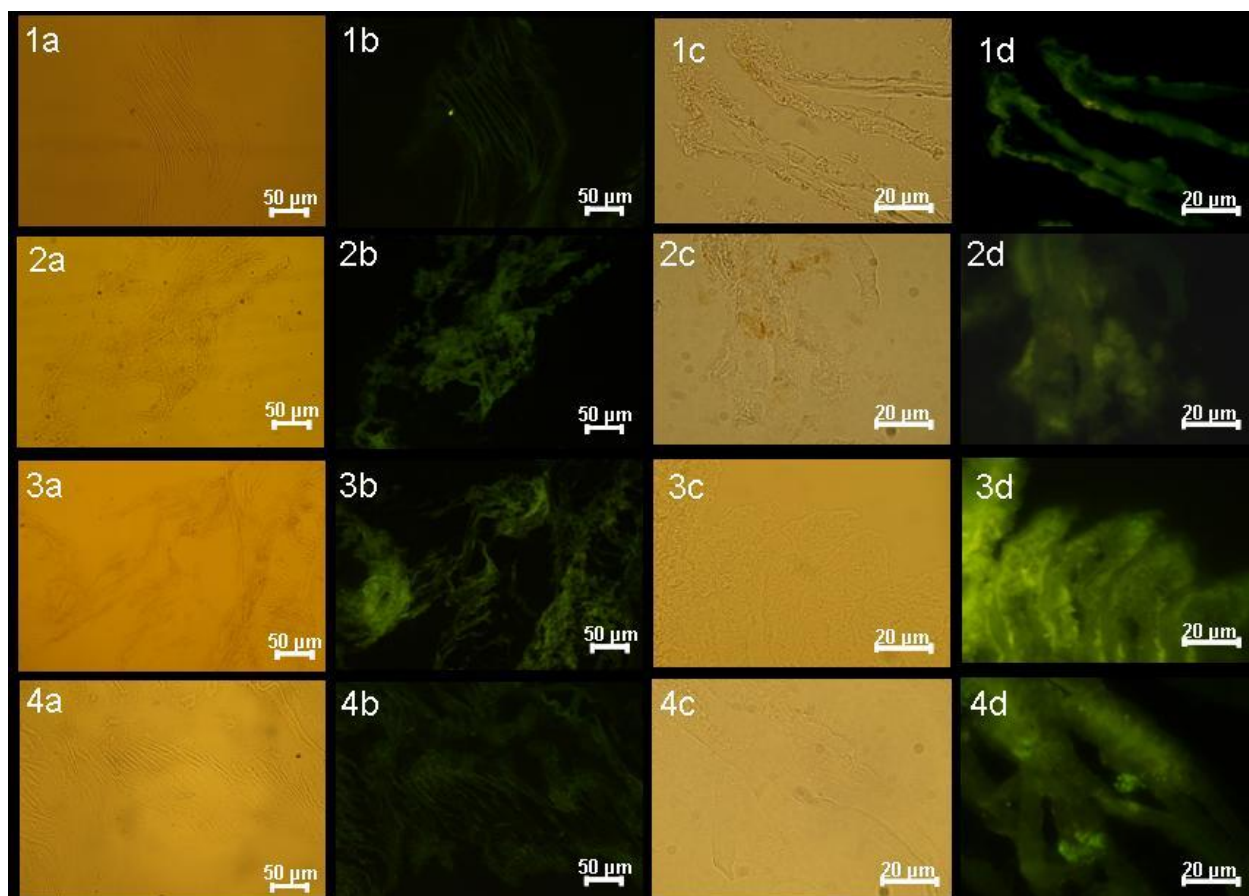
La technique du TUNEL est appliquée à des coupes de branchies de moule exposées à de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des conditions qui, d'après les données de Hamer et al. (2009), provoquent le maximum d'altérations de l'ADN (1 h d'exposition à 0,222 mmol/L).

Pour interpréter aisément les échantillons en microscopie à fluorescence, nous avons au préalable examiné des coupes sériées, colorées par l'hémalun-éosine. Sur ces coupes, les filaments branchiaux limités par un épithélium simple prismatique et reposant sur le tissu conjonctivo-musculaire de soutien sont visibles (Fig. 9).



**Fig.9. Structure histologique des branchies de moule témoin colorées à l'hémalum-éosine**

L'observation des coupes traitées selon la méthode TUNEL, réalisée à partir d'animaux exposés à l'eau oxygénée, montre des cellules épithéliales, souvent en « cluster », fortement fluorescentes, ce qui démontre qu'il s'agit de cellules apoptotiques dont l'ADN est altéré. Les filaments branchiaux sont en outre désorganisés (Fig 10, 2b-2d), comparativement aux témoins non traités (Fig. 10, 1b-1d).

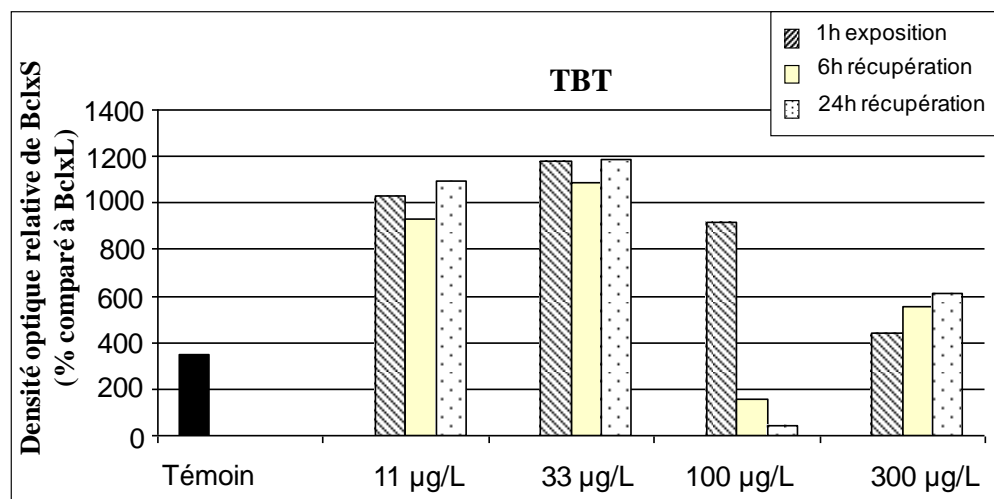


**Fig. 10. Méthode TUNEL sur coupes de branchies de *M. galloprovincialis*. Moules témoin (1) et traitées pendant 1 h par 2 mmol/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2), 33 µg/L de TBT (3) et 7.5 % de HAPs (4).**

### **TBT**

#### **➤ Expression de Bcl-xS**

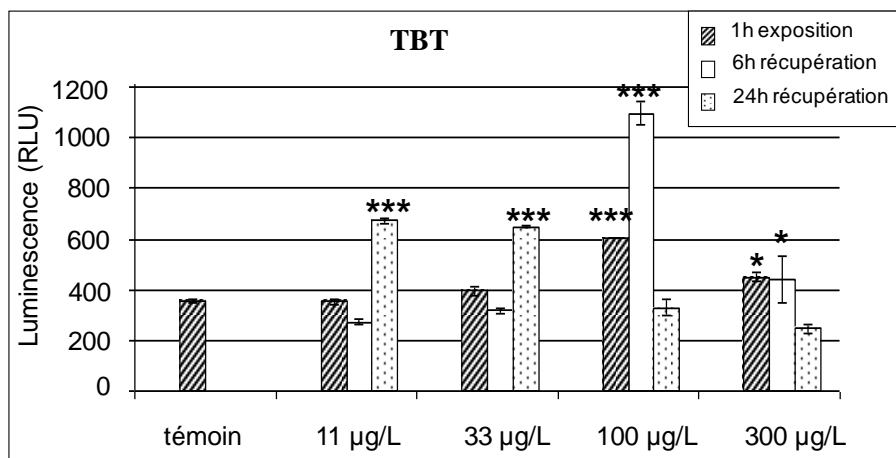
Comme l'illustre la figure 11, les concentrations en TBT de 11 et 33 µg/L induisent une forte expression de Bcl-xS, « signalant » un processus apoptotique. En outre, le niveau d'expression de cette protéine reste élevé après 6 h et 24 h de récupération des animaux dans l'eau de mer. Pour 100 µg/L de TBT, l'activation de Bcl-xS après 1 h d'exposition est suivie d'une diminution après 6 h et 24 h hors présence de ce composé. Au contraire, une concentration de 300 µg/L n'induit qu'une faible expression de la protéine à 1 h.



**Fig. 11.** Expression de Bcl-xS (exprimé en % par rapport au taux de Bcl-xL) après exposition de *M. galloprovincialis* à différentes concentrations de TBT, analysée par Western blot (la quantification est réalisée à partir d'un seul blot)

### ➤ Activité de la caspase 3

L'étude de la caspase 3 montre une activation à 24 h suite à l'exposition à 11 et 33 µg/L de TBT. Une concentration de 100 µg/L entraîne une augmentation progressive de cette enzyme après 1 h d'exposition, atteignant un niveau maximum à 6 h, suivi d'une diminution à 24 h. Une faible activation de la caspase 3 à 1 h et 6 h est notée pour 300 µg/L de TBT (Fig. 12).



**Fig. 12.** Activité de la caspase 3 chez *M. galloprovincialis* exposée à différentes concentrations de TBT (en unités de fluorescence) (n=4)

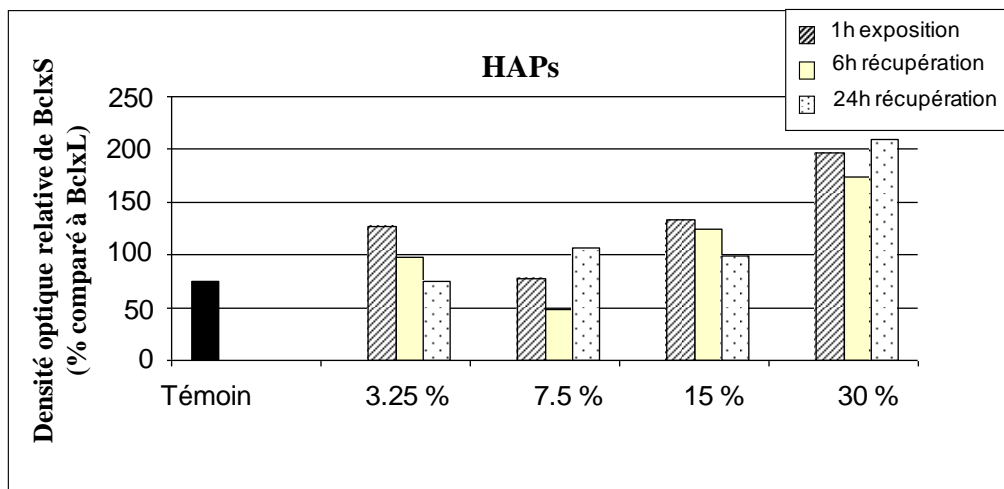
### ➤ *Intégrité de l'ADN*

L'étude au microscope à fluorescence (méthode TUNEL) des coupes d'animaux exposés à 300 µg/L de TBT révèle une désorganisation des filaments branchiaux (Fig. 10, 3a, c) et des zones très réactives (Fig. 10, 3b,d).

## **HAPs**

### ➤ *Expression de Bcl\_xS*

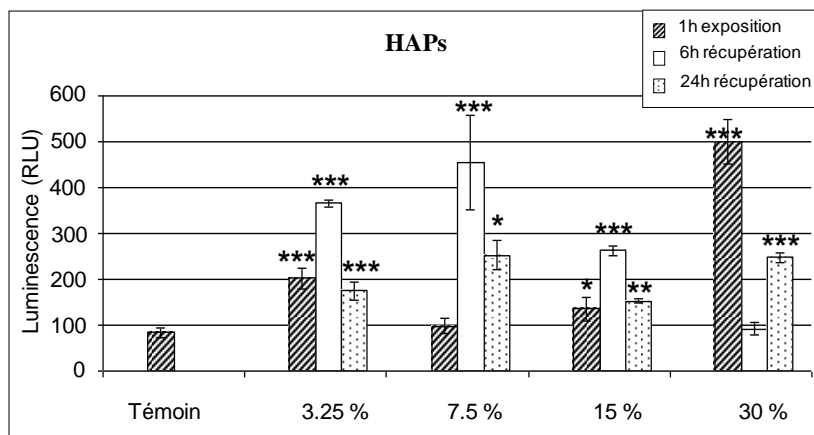
Une induction dose-dépendante de l'expression de Bcl-xS est constatée à 1 h pour des concentrations en HAPs de 7,5 à 30 %. De manière surprenante, le taux de Bcl-xS après exposition à 7,5% d'HAPs est proche de celui du contrôle. Pour des concentrations de 3,25 et 15 %, une augmentation de l'expression de Bcl-xS est induite à 1 h, suivie par une faible diminution à 6 h et 24 h hors présence de ces composés, alors que pour les deux autres concentrations (7,5 et 30 %), l'expression est de nouveau forte à 24 h (Fig. 13).



**Fig. 13.** Expression de Bcl-xS (exprimé en % par rapport au taux de Bcl-xL) après exposition de *M. galloprovincialis* à différentes concentrations de HAPs, analysée par Western blot (la quantification est réalisée à partir d'un seul blot)

### ➤ *Activité de la caspase 3*

L'incubation des moules en présence de HAPs induit à 6 h les plus forts taux d'activité de la caspase 3 pour des concentrations de 3,25, 7,5 et 15 %. Au contraire, pour les HAPs à 30 %, une forte activité de cette enzyme est mesurée dès 1 h (Fig.14).



**Fig. 14. Activité de la caspase 3 chez *M. galloprovincialis* exposée à différentes doses de HAPs (en unité de luminescence) (n = 4)**

### ➤ *Intégrité de l'ADN*

Contrairement aux autres agents chimiques testés, les HAPs ne modifient pas la structure des branchies. En revanche, une forte fluorescence est observée sur les coupes, par la technique du TUNEL. Les cellules dont l'ADN est fragmenté, donc marquées par ce fluorochrome, sont regroupées en « clusters » (Fig. 10, 4 b et d).

## 2. Etude *in situ*

Les résultats des analyses portant sur les échantillons prélevés dans 19 stations de la côte croate montrent :

- une plus forte activation des MAP kinases en été qu'en hiver, la température de l'eau étant de 27°C et la salinité de 35, en moyenne en été contre 10°C pour la température et 23 g ‰ pour la salinité en hiver
- une forte activation des MAPKs dans les stations du nord de la mer adriatique, plus polluées qu'au Sud.

### **III. Discussion / Conclusion**

#### **Séquençage des gènes**

Le séquençage des gènes codant pour JNK et ERK chez *M. galloprovincialis* révèle une forte homologie de séquences avec celles des Mammifères, avec notamment la présence, dans les 2 cas, d'un domaine protéine kinase hautement conservé. Ce domaine est situé en amont des sites de phosphorylation qui ont pour motif TXY, importants pour la phosphorylation, donc pour l'activation de ces MAP kinases. Ces données sont en accord avec Müller et al. (2002) ; selon ces auteurs, les gènes codant pour le MAP kinases sont très conservés au cours de l'évolution et p38 et JNK proviendraient d'un même gène ancestral ayant acquis des introns. L'identification du gène codant pour la p38 est en cours au laboratoire.

#### **Essais toxicologiques en laboratoire**

D'après les résultats obtenus après exposition des animaux à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, composé utilisé pour disposer d'un contrôle positif d'induction des MAP kinases (Zrouri et al., 2004) et de l'apoptose (Palomba et al., 1999 ; Li et al., 2000 ; Das et al., 2001), il apparaît clairement que ce traitement des moules provoque une induction par phosphorylation de p38 et de ERK mais pas de JNK. Ceci est conforme aux conclusions de Gaitanaki et al. (2003) et de Carter et al. (2002), travaillant respectivement sur des cellules d'amphibien et des cellules de manteau de *M. galloprovincialis*.

L'absence d'activation de JNK peut s'expliquer selon l'hypothèse de Masuda et al. (2003) : l'activation de ERK induirait la phosphorylation de la MAPK phosphatase 7 (MKP-7) qui inactiverait JNK. Une surexpression de Hsp70 pourrait aussi inhiber JNK induit *via* un mécanisme impliquant la fixation directe de Hsp70 sur JNK (Park et Liu, 2001).

Nous avons aussi constaté pour les lots exposés à de l'eau oxygénée, l'induction d'une protéine de 30 KDa dès 1 h pour toutes les concentrations testées, non observée pour les témoins. Nous supposons qu'il s'agit de Bcl-xS, protéine pro-apoptotique. Bcl-x est composée de 2 formes : la forme longue ou Bcl-xL, au rôle anti-apoptotique et la forme courte Bcl-xS, impliquée dans l'apoptose par formation d'un dimère avec Bcl-xL ou Bcl-2 dont elle neutralise l'activité (Boise et al., 1993 ; Minn et al., 1996). Bcl-x n'a pas été étudiée chez la moule. Quant à Bcl-xS, l'une

des premières protéines pro-apoptotiques isolées chez les Mammifères, ses mécanismes d'action et son rôle dans la mort cellulaire ne sont pas bien décrits.

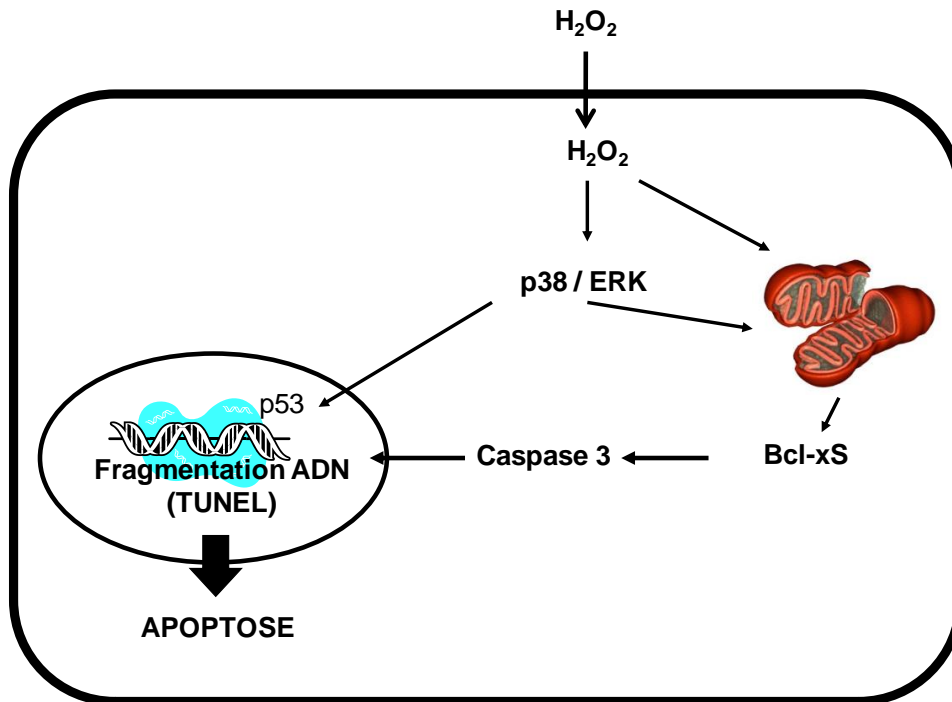
Lindenboim et al. (2000) ont montré dans des cellules PC12, que l'activité caspase était impliquée dans l'apoptose médiée par Bcl-xS. D'après nos résultats, l'activation de cette protéine de 30 KDa est corrélée à l'activité de la caspase 3, à 1 h, sauf pour 0,222 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans ce cas, un décalage de 6 h est observé dans l'induction des 2 protéines ; il peut être expliqué par un asynchronisme des cellules entrant en apoptose.

Les dommages de l'ADN induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se traduisent par des modifications de bases, en particulier selon la réaction de Fenton, formant des groupements hydroxyles (OH-) qui interagissent avec l'ADN par addition de doubles liaisons entre les bases (Von Sonntag, 1987; Halliwell et Aruoma, 1991). Nos résultats montrent une fragmentation de l'ADN double brin d'origine apoptotique, détectée par la méthode TUNEL. Liu et al. (1997) ont montré que le facteur de fragmentation (ou DFF), composé de DFF40 et 45, était capable de provoquer une fragmentation « apoptotique » de l'ADN en présence de caspase 3 activée. Chez la moule, après induction de l'apoptose, DFF45 pourrait être clivé par la caspase 3 et se séparer de DFF40, ce qu'ont montré Liu et al. (1997) et Nagata (2000). Le DFF40 libéré pourrait couper l'ADN en fragments nucléosomiques, caractéristiques de l'apoptose, comme l'indiquent Zhang and Xu (2000).

Nous avons également noté une désorganisation de la structure des branchies. Cette observation est conforme aux données de Tort et al. (2002) qui ont montré des lésions des branchies de truite après exposition à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus pour *M. galloprovincialis* exposée en laboratoire à de l'eau oxygénée permet de proposer le schéma de la figure 15, résumant chez cette espèce, les mécanismes induisant les voies de signalisation des MAP kinases. Il valide également les techniques mises en œuvre, qui permettent d'obtenir des données en adéquation avec celles de la littérature.





**Fig. 15.** Schéma explicatif de l'induction des voies de signalisation par  $H_2O_2$  chez *M. galloprovincialis*

### **TBT**

Contrairement à  $H_2O_2$ , le TBT, à 33 et 100  $\mu\text{g/L}$  pendant 1 h, active p38 et JNK mais pas ERK. Mais le maximum d'activation de p38 et de JNK est observé après 6h de stabulation dans de l'eau de mer, suite à un traitement par 11 $\mu\text{g/L}$  de TBT. Cette activation n'est donc pas dose-dépendante, en accord avec les données d'Aluoch et al. (2006) pour des cellules NK humaines. Conformément aux hypothèses de Gaitanaki et al. (2004), après des travaux sur le manteau de *M. galloprovincialis*, il se peut que les substrats de p38 soient localisés dans le cytoplasme plutôt qu'au niveau du noyau. De ce fait, les MAPKs pourraient être réactivées par leurs substrats (Kyriakis et Avruch, 1996 a,b), expliquant une persistance d'activité lorsque les animaux sont remis en eau dépourvue de TBT.

Concernant ERK, elle est non seulement « non-activée » mais légèrement diminuée, ce qui a aussi été observé pour des embryons d'ascidie exposés à des concentrations de TBT de 0,1 à 0,5  $\mu\text{M}$  (Damiani et al., 2009).

Quant à Bcl-xS, son expression est induite après 1 h d'exposition aux diverses concentrations de TBT mais à moindre degré pour les deux plus fortes concentrations.

Nos résultats révèlent un décalage de 18 h entre l'activation des MAP kinases (p38 et JNK) et celle de la caspase 3 pour les deux plus faibles concentrations testées. Ce décalage n'est que de 6h pour la concentration de 100 µg/L de TBT. A la plus forte concentration (300 µg/L), l'activation de la caspase 3 et celle de p38 sont simultanées, ce qui suggère qu'à forte dose, la caspase dépend de l'activation de p38. Or Owuor et Kong (2002) ont montré que la caspase 3 était dépendante de JNK dans des cellules de truite exposées au TBT. Ceci peut aussi être le cas pour la moule mais uniquement pour les faibles concentrations.

Il semblerait que pour les faibles doses de TBT, on ait une activation immédiate de Bcl-xS par les MAP kinases p38 et JNK, puis une activation de la caspase 3, 18 h plus tard. En revanche, aux fortes concentrations, p38 est seule responsable de la légère augmentation de Bcl-xS et d'une activation immédiate de la caspase 3, mais à un niveau plus bas que pour les autres concentrations.

Nakatsu et al. (2007) ont aussi montré dans des cellules PC12 qu'une concentration faible de TBT (100 µg/L) induisait l'apoptose, donc l'activation de la caspase 3 *via* l'activation de JNK, alors qu'une forte concentration de 300 µg/L impliquait les radicaux libres et non JNK. Chen et al., 1998; Morishima et al., 2001 ont également corrélié le rôle des radicaux libres ou de JNK à l'activation de la caspase 3. Le rôle du calcium dans la phosphorylation de JNK a aussi été suggéré (Kim et Sharma, 2004; Yu et al., 2000).

Le TBT est connu pour sa génotoxicité. Il agit en modifiant la méthylation des bases nucléotidiques, ce qui influe sur l'expression des gènes (Wang et al., 2009). De plus, il est à l'origine de la production de radicaux libres qui ont un effet direct sur l'ADN (Von Sonntag, 1987). Les données de Fafandel et al. (2003) ont montré pour des éponges exposées au TBT, une modification de l'expression et de la phosphorylation de la KRS kinase (a stress-responsive protein serine/threonine kinase), protéine impliquée dans l'induction de l'apoptose. Ceci est conforme à nos résultats puisque nous avons observé une fragmentation de l'ADN, détectée par méthode TUNEL. Nos données sont également en adéquation avec celles de Micic et al. (2001), pour *M. edulis*. La désorganisation des filaments branchiaux que nous avons observée après exposition au TBT est en accord avec les données de la littérature (Micic et al., 2001).

## **HAPs**

Ces composés induisent chez *M. galloprovincialis*, comme le TBT, une activation de p38 et de JNK. De plus, l'activation de p38 est dose-dépendante après 1h d'exposition. Un tel résultat a également été obtenu par Burlando et al. (2006) chez *M. edulis*.

Cependant, selon les données de la littérature, la toxicité des HAPs varie en fonction de leur structure. Dans les cellules de foie humain, le benzo(a)pyrène induit la phosphorylation de p38 et de ERK1/2 (Chen et al., 2003) et chez la souris, celle de JNK (Lei et al., 1998). De plus, il a été montré que les isomères de l'anthracène ont des effets opposés sur l'activation de ERK1/2 en relation avec leur structure (Rummel et al., 1999).

Dans des cellules d'hépatome (Landvik et al., 2007), les HAPs induisent l'accumulation de p53 dans le noyau, la diminution de l'expression de Bcl-xL, l'activation de la caspase 3, parallèlement à celle de p38 et de JNK, conformément à nos données puisque Bcl-xS et la caspase 3 sont induites successivement lorsque les concentrations en HAPs augmentent.

Cependant, pour les HAPs, il semble que ce soit p38 qui soit impliquée dans la médiation de l'apoptose, comme démontré par Chen et al. (2003) pour le benzo(a)pyrène car un inhibiteur de p38 empêche l'activation des caspases.

La présence de corps apoptotiques, détectés par la méthode TUNEL et la désorganisation des filaments branchiaux, sont le résultat selon Torres-Bugarin et al. (1998) d'un processus de détoxification qui conduit à la formation d'adduits de l'ADN.

Micic et al. (2002) ont montré chez la moule que des concentrations de 5 to 20 µg/g de benzo(a)pyrène étaient à l'origine d'une réparation par excision des adduits mais ne provoquait pas l'apoptose, contrairement à nos données.

Le potentiel génotoxique des HAPs est déjà bien documenté chez les Mammifères (Nishikawa et al., 2005) et également chez les bivalves (Burgeot et Galgani, 1995; Venier et al., 1997; Siu et al., 2004 ; Bolognesi et al., 1996).

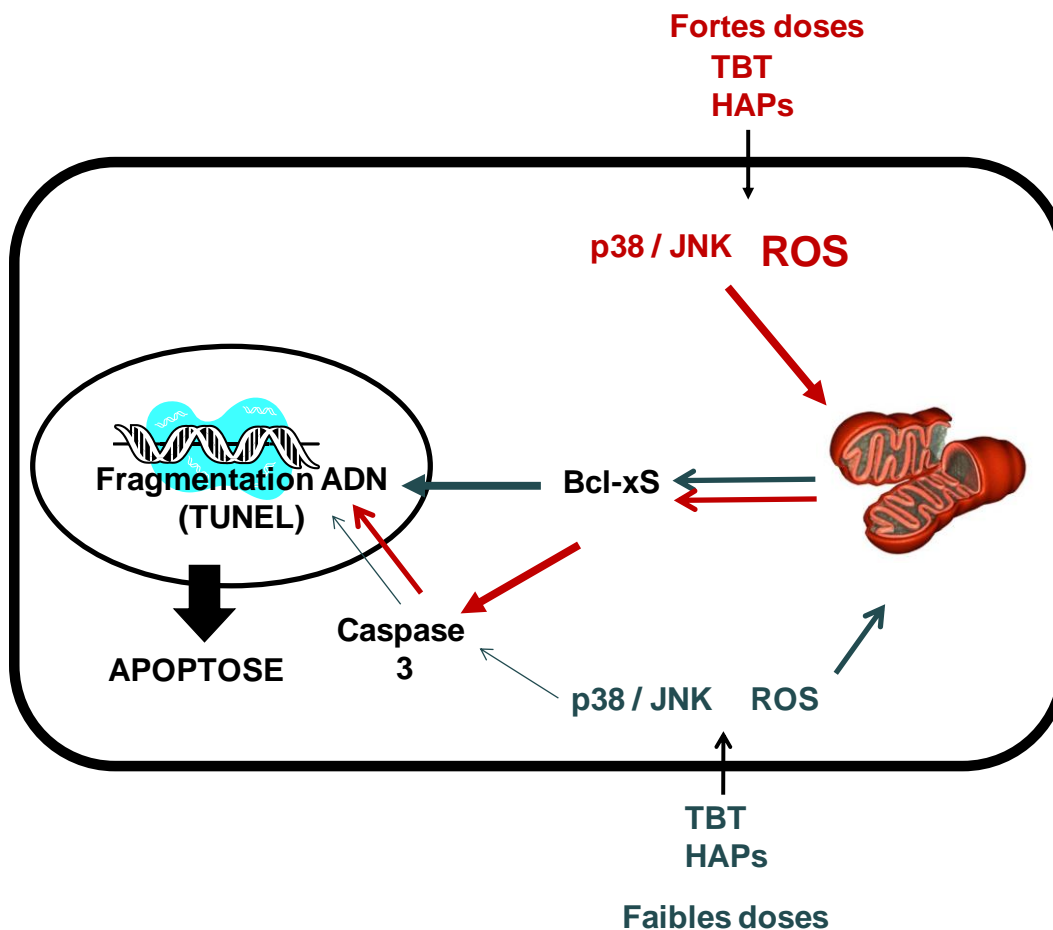
L'ensemble de nos résultats pour le TBT et les HAPs permet de conclure à :

- une induction de Bcl-xS et de l'apoptose,
- une production de radicaux libres, à l'instar de ce qui a été démontré chez les Vertébrés et chez des Invertébrés (Pruski et Dixon, 2002 ; Abele et al., 2002 ; Lannig et al., 2006).

Cependant, selon les concentrations utilisées, nous pouvons supposer l'existence de 2 voies d'induction de l'apoptose :

- à faibles concentrations, une voie apoptotique indépendante de la caspase 3, conformément à ce que suggère Sokolova (2009) pour l'huître *C. virginica* car un inhibiteur spécifique de la caspase 3 n'a aucun effet sur l'apoptose. Cette voie implique essentiellement chez les Mammifères, deux molécules effectrices, l'AIF (Apoptosis inducing factor) et l'endonucléase G mitochondriales (Van Loo et al., 2001; Li et al., 2001; Cande et al., 2002; Tait and Green, 2008). Ces 2 protéines vont de la mitochondrie au noyau où elles se lient à l'ADN, déclenchant l'apoptose. Une partie du gène codant pour AIF a été cloné chez l'huître (MGID89694). P53, récemment cloné chez *M. galloprovincialis* (Banni et al., 2009), peut également déclencher l'apoptose soit par activation de l'expression de gènes, soit par inactivation de protéines anti-apoptotiques mitochondriales (Bottger et al., 2008).
- Pour de fortes concentrations, une voie apoptotique dépendante de la caspase 3 .

Les mécanismes aboutissant à l'apoptose selon les concentrations de TBT et de HAPs sont résumés par la figure 16.



**Fig. 16. Mécanismes probables d'induction de l'apoptose par le TBT et les HAPs chez la moule *M. galloprovincialis***

### *Approche in situ*

Les expériences réalisées *in vivo* au laboratoire permettent de suivre l'effet d'un polluant ou d'un mélange donné de polluants à l'échelle de l'individu ou de quelques individus mais il est nécessaire que de telles études soient complétées par une approche *in situ* pour apprécier les risques à l'échelle d'une population dans un environnement complexe où interfèrent plusieurs facteurs physico-chimiques influant sur les réponses biologiques (Colosio et al., 2005 ; Galloway et Depledge, 2001). C'est pourquoi, depuis 1999, le WGBEC (Working Group on Biological Effects of Contaminants) a préconisé de prendre en compte notamment la température et la salinité, lors d'études écotoxicologiques et d'identification de biomarqueurs d'intérêt.

Bien que la salinité soit relativement constante en mer Adriatique ( $36.96 \pm 0.77$  g ‰) au niveau des zones intertidales et des estuaires, elle varie néanmoins en raison d'évènements pluvieux en particulier (programme "Project Adriatic"). Quant à la température de l'eau, elle fluctue entre 10°C en hiver et 27°C en été. De tels écarts, sources de stress, peuvent avoir un impact à l'échelle de la cellule, de l'organisme, d'une population, donc *in fine*, sur la biodiversité (Nevo, 2001; Parsons, 2005).

L'impact de la température est probable compte tenu des résultats que nous avons obtenus à partir des moules collectées dans 19 sites répartis du Nord au Sud sur la côte croate car nous notons globalement une plus forte activation des MAP kinases p38 et JNK en été qu'en hiver. Le stress thermique, lors de la collecte des animaux en été peut aussi expliquer par partie cet écart. Anestis et al. (2007) émettent l'hypothèse que la voie de signalisation des MAP kinases intervient dans la régulation de l'expression des Hsp chez *M. edulis*, comme c'est le cas chez les Mammifères (Sheikh-Hamad et al., 1998; Rafiee et al., 2003).

L'activation différentielle des MAPKs observée dans le Sud en fonction des saisons ne peut s'expliquer par des problèmes de pollution car ils sont limités dans cette zone. Les variations de température et les différences d'osmolarité selon les sites en sont vraisemblablement la cause majeure.

Dans la littérature, l'activation de p38, et de son homologue chez la levure HOG1, en réponse à un stress osmotique a été bien étudiée tant chez les levures (Zhang et al., 2002), que chez les plantes (Munnik et Meijer, 2001), ou dans le règne animal, chez les oursins (Casano et al., 2003), les poissons (Fiol and Kultz, 2007) et les Mammifères (Chen et Gardner, 2002 ; Dahl et al., 2001 ; Xu et al., 2001). Les études de Kultz et Avila (2001) chez un poisson démontrent le rôle des MAPKs en réponse à un stress osmotique car les taux de phosphoenzymes augmentent lors d'un stress hypoosmotique et diminuent en cas de stress hyperosmotique.

Pour la partie nordique, comprenant les sites de Pula, Rijeka et Zadar, les sources de contamination de l'eau sont nombreuses ; les taux des MAPKs sont plus élevés en été qu'en hiver et supérieurs à ceux mesurés au sud pour les mêmes périodes. Ceci autorise à penser que les polluants chimiques, au rang desquels les HAPs et le TBT, ont un impact sur les voies de signalisation étudiées.

Cette étude *in situ* montre donc que l'interprétation de données obtenues à partir d'animaux prélevés dans le milieu naturel où ils sont soumis à différents types de stress sur une longue durée, est beaucoup plus complexe que pour celles acquises en laboratoire, en conditions contrôlées. Pour pouvoir tirer des conclusions, il convient de disposer du maximum d'informations concernant le milieu naturel tant au plan physico-chimique que purement chimique.

***Pour conclure, les travaux consacrés à la moule nous ont permis :***

- de caractériser les 2 gènes codant pour JNK et ERK ;
- de démontrer, en utilisant le test ELISA mis en place chez l'éponge, que le TBT et les HAPs activent les MAPKs et induisent l'apoptose par l'intermédiaire de la voie intrinsèque ;
- de constater que dans certaines conditions, la moule utilise une voie apoptotique indépendante de la caspase 3 ;
- de mettre en évidence que l'induction des MAPKs est influencées par les facteurs environnementaux (salinité, température et pollution anthropique).

## DISCUSSION/CONCLUSION



Les activités humaines endommagent l'environnement par accident ou de manière chronique (Devauchelle, 2002). L'écotoxicologie a pour but d'analyser les effets des polluants sur les écosystèmes, l'impact des xénobiotiques sur les êtres vivants pouvant être évalué à différents niveaux, à l'échelle moléculaire, subcellulaire, cellulaire, individuelle et populationnelle (Alzieu, 1994). Les indicateurs de la qualité du milieu sont donc nombreux et variés, passant de l'étude de la structure et de la dynamique des peuplements, à l'utilisation de marqueurs moléculaires permettant d'évaluer par exemple l'action génotoxique et potentiellement mutagène, d'un composé donné. Selon le niveau d'analyse, identifier les causes d'un effet donné est un problème plus ou moins complexe, d'autant qu'un animal affaibli par une pollution chimique par exemple, sera plus sensible à un microorganisme pathogène (et inversement) ou à un germe opportuniste. De plus, dans le milieu naturel, les organismes sont soumis à des variations de température et parfois d'osmolarité ainsi qu'à des polluants dont les concentrations peuvent varier quantitativement et qualitativement dans le temps et agir en synergie. Il est donc nécessaire de tenter de reproduire sur des animaux en laboratoire, dans des conditions contrôlées, les effets observés dans le milieu naturel pour les comprendre et les expliquer.

Les expériences réalisées au cours de ce travail pour évaluer, à l'aide « d'indicateurs moléculaires », à l'échelle de l'organisme, l'effet de deux types de polluants, le TBT et les HAPs, sont donc très incomplètes et modestes, même en ayant eu une double approche expérimentale (conditions contrôlées et situation naturelle), et en ayant choisi deux espèces cibles (moule et éponge) qui vivent dans des biotopes différents mais qui ont en commun leur sédentarité et une capacité importante de filtration de l'eau, donc de bioaccumulation de xénobiotiques polluants.

Le choix de l'éponge en tant qu'espèce cible est l'une des originalités de cette étude. Cet invertébré marin est l'un des modèles biologiques d'intérêt au laboratoire de l'Université de Mainz où s'est déroulé la majeure partie de ce travail. L'éponge est un animal qui présente l'avantage d'une organisation simple au plan anatomique et structural, d'avoir une capacité de bioaccumulation de xénobiotiques importante puisque toute la surface épithéliale, interne comme externe, est en contact direct de l'eau de mer. Il s'agit aussi d'un organisme capable de régénération. L'inconvénient par rapport à la moule est la nécessité de disposer de moyens logistiques appropriés pour les collecter à une profondeur d'au moins 15 m.

Toutefois, nous avons dû réaliser en laboratoire des expérimentations sur des fragments d'éponge et non sur l'éponge entière, pour faciliter les incubations, répéter et standardiser les essais. Une

induction de la cycline D1 en lien avec la régénération des tissus est observée suite à ce stress mécanique provoquant l'activation de ERK. Il est donc nécessaire de tenir compte de ce « biais méthodologique » lors de l'interprétation des résultats. Il serait souhaitable de vérifier nos données sur des organismes complets même si après exposition à des toxiques, le niveau d'activation de ERK est nettement plus élevé que sur les témoins.

Pour la moule, nous avons choisi de réaliser nos analyses à partir des branchies dont le rôle dans la nutrition des bivalves est bien connu. Grâce aux mouvements ciliaires des cellules épithéliales à microvillosités, à la sécrétion de mucus par les mucocytes dispersés entre les cellules absorbantes de l'épithélium, les branchies interviennent dans les mouvements d'eau et de la rétention et/ou l'acheminement de particules vers les palpes labiaux ainsi que dans l'absorption (Beninger et Dufour, 1996). Nous avons choisi de réaliser nos analyses sur les branchies car elles constituent une large surface de contact avec l'eau intervalvaire, amplifiée par les macrovillosités que sont les différents plis et filaments branchiaux et par les microvillosités apicales des cellules épithéliales. Elles sont, de ce fait, largement en contact avec les substances dissoutes et les particules véhiculées par l'eau et aptes à bioaccumuler certains composés.

Une autre particularité de notre travail concerne le lieu de prélèvement des animaux, la mer adriatique. Il s'agit là d'un contexte environnemental intéressant, semi-fermé, que les autorités s'emploient actuellement à protéger. Dans la mesure où des programmes se mettent en place pour analyser et contrôler les niveaux et les types de pollution, les animaux qui y vivent constitueront des modèles expérimentaux d'intérêt pour évaluer la « pertinence » d'un biomarqueur d'effet d'une exposition à un ou plusieurs types de polluants et pour corréler les données obtenues avec celles que l'on peut acquérir en conditions contrôlées en laboratoire.

Un aspect intéressant de nos travaux est d'avoir pu réaliser :

- les mêmes analyses chez deux espèces, dont certaines, comme la mesure d'activité de la caspase 3 ou l'étude de l'apoptose sur coupes d'organe par la méthode TUNEL, n'ont été jusqu'à présent que peu ou pas mises en oeuvre pour les invertébrés marins,
- une double approche, *in situ* et en laboratoire.

Nous avons ainsi pu aborder la toxicologie à l'échelle de l'organisme, de la cellule, au niveau moléculaire, dans des situations expérimentales différentes.

Actuellement, la toxicologie utilise de plus en plus les outils moléculaires. Dans ce domaine, il reste « beaucoup à faire » pour les invertébrés marins. En protéomique, s'il existe des anticorps polyclonaux dirigés contre des protéines d'invertébrés marins, ils sont produits dans certains laboratoires de recherche « selon les besoins ». A notre connaissance, il y a peu ou pas d'anticorps monoclonaux et aucune firme n'en commercialise. L'une des perspectives de ce travail, qu'il conviendrait de privilégier, serait la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines d'invertébrés marins d'intérêt en toxicologie, telles que les MAPs kinases.

L'objectif de ce travail était de mettre en place un test ELISA pour étudier, en réponse à un stress d'origine chimique, l'activation de protéines appartenant aux voies de signalisation, chez la moule *M. galloprovincialis* et l'éponge *S. domuncula*.

Nous nous sommes ainsi intéressés à des protéines intervenant à différents niveaux dans la cascade de signalisation intracellulaire (p38, JNK, ERK, Bcl-xS) et à l'une des réponses cellulaires à leur activation, l'apoptose.

### Résultats majeurs

- Nous avons défini les conditions expérimentales d'un test ELISA applicable à l'éponge *S. domuncula* et à la moule *M. galloprovincialis* pour étudier le niveau d'expression de protéines de la cascade de signalisation intracellulaire des MAP kinases. Ce test pourrait être appliqué à d'autres bivalves marins et selon l'espèce, à d'autres tissus.
- Nous avons démontré en utilisant cette méthode analytique, que les deux types de polluants testés, le TBT et les HAPs, ont un effet sur les MAP kinases, p38, JNK et ERK, et sur les acteurs de l'apoptose, la caspase 3 et Bcl-xS, se traduisant le plus souvent, en terme de réponse, par une induction de l'apoptose, sauf chez l'éponge pour de faibles concentrations en HAPs, où l'animal est capable de corriger les dommages de l'ADN.

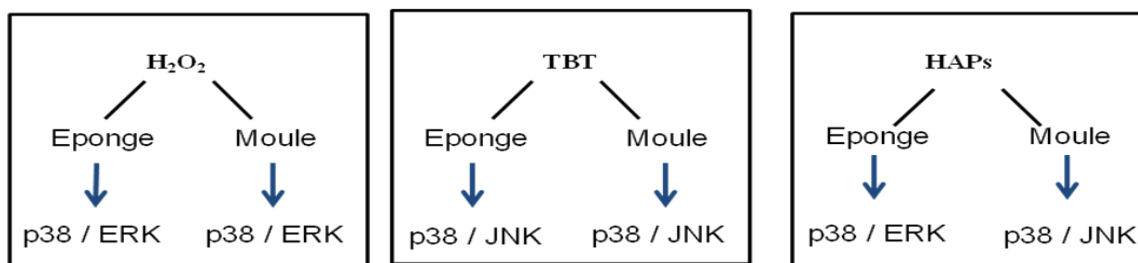
Cependant, pour les différentes conditions d'exposition aux xénobiotiques choisies, les moules et les fragments d'éponges survivent au traitement, certes court (1h), malgré les messages de mort cellulaire que nous avons généralement constatés. L'hypothèse d'une régénération cellulaire par prolifération de cellules souches peut donc être envisagée. Chez les bivalves, nous n'avons pas connaissance de travaux consacrés à la caractérisation des telles cellules. Il est toutefois vraisemblable que des cellules unipotentes soient localisées sous les épithéliums qui recouvrent,

chez ces animaux, la surface externe de divers organes, à l'instar de ce qui est connu chez les mammifères. Cette hypothèse est étayée par des données de culture *in vitro*. Une activité de croissance limitée a été démontrée (Talarmin et Fritayre et al., en préparation) par exemple pour des cultures de cellules de cœur de bivalves (coquille st jacques, huître, palourde).

Concernant l'éponge, des travaux dont la synthèse a récemment été faite par Müller et al. (2009) permettent de conclure que les archéocytes, situés dans le tissu conjonctif ou mésenchyme mais aussi au niveau de l'épithélium interne ou endopinacoderme, sont des cellules souches multipotentes capables de se différencier en divers types de cellules somatiques (et en cellules germinales), donc de régénérer les tissus. Le processus est rapidement mis en place comme en attestent les résultats que nous avons obtenus lorsque nous avons voulu vérifier l'impact de la fragmentation des éponges sur l'induction de la cycline D1, ce qui sous-entend l'activation préalable de ERK, protéine kinase impliquée dans la voie de signalisation aboutissant à la prolifération cellulaire.

- Nous avons constaté une activation différentielle des MAP kinases selon le composé testé et/ou selon l'espèce cible, à l'exception de p38, activée dans toutes les conditions expérimentales, ce qui montre son rôle central dans la transmission des signaux extracellulaires chez les invertébrés.

La figure 1 résume de manière simple la variabilité des réponses des deux espèces au TBT et aux HAPs, et pour comparaison, à l'eau oxygénée.



**Fig. 1. Activation différentielle des MAP kinases en fonction du polluant testé et/ou de l'espèce cible**

- Nous avons observé comme réponse cellulaire à l'exposition aux polluants, une induction de l'apoptose, comme le démontre l'étude de la caspase 3, peu étudiée chez les invertébrés marins et la méthode TUNEL, peu utilisée à notre connaissance chez ces animaux jusqu'à présent, à l'exception de Micic et al. (2001) chez la moule.

Il apparaît toutefois que selon l'animal, il y a une ou deux voies possibles conduisant à l'apoptose comme l'illustre la figure 2.

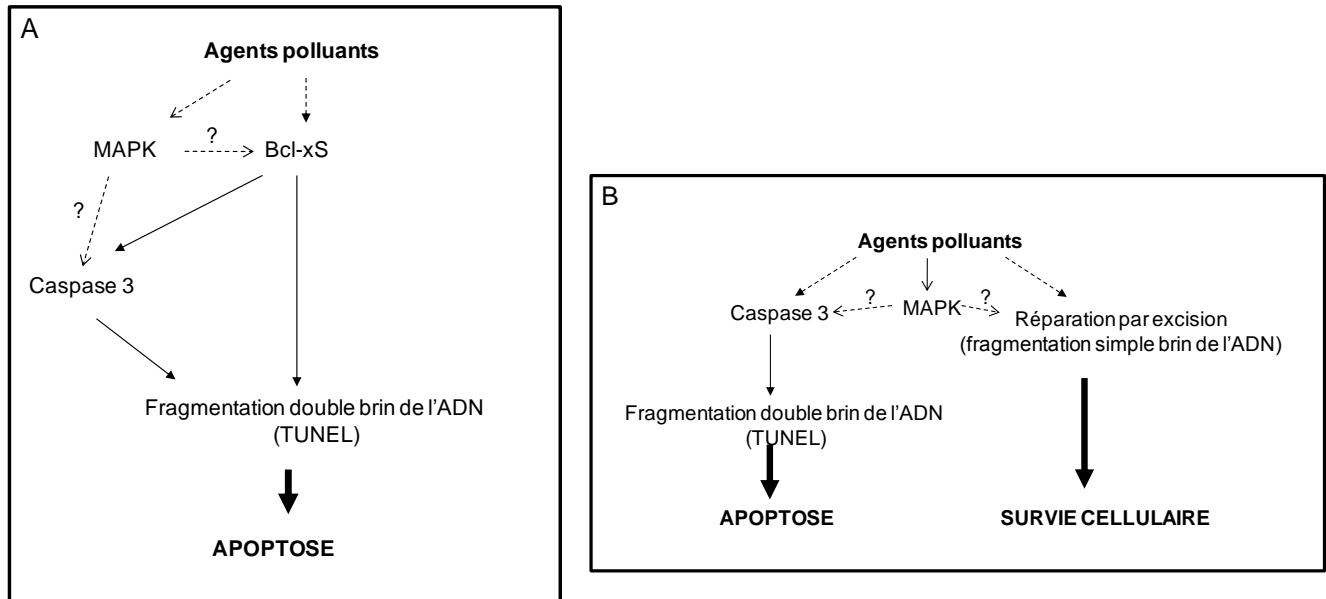


Fig. 2. Voies de signalisation chez la moule (A) et chez l'éponge (B) en réponse à deux types de polluants marins, le TBT et les HAPs

Les moules utilisent la voie intrinsèque de l'apoptose puisque Bcl-xS, protéine pro-apoptotique mitochondriale, est activée. Cette protéine agit ensuite soit directement pour déclencher ce processus pour de faibles concentrations de polluant, soit *via* la caspase 3 pour de plus fortes concentrations (Fig.2 A). Chez l'éponge (Fig.2 B), il n'a pas été possible, pour des raisons techniques probablement liées à un manque de spécificité de l'anticorps anti-Bcl-x, de vérifier si la voie intrinsèque mitochondriale était aussi impliquée dans l'apoptose. Il est, en revanche, clair, que p38 est systématiquement activée et il est certain que la caspase 3 l'est aussi pour l'entrée en apoptose.

Comme le montre la figure 2, de nombreuses questions restent posées à l'issu de ce travail sur la cascade de réactions aboutissant à une survie cellulaire ou à de l'apoptose.

Si nous avons mis en évidence une activation des MAP kinases et une induction de l'apoptose dans certaines conditions expérimentales, il s'avère nécessaire de compléter les études en utilisant

notamment des inhibiteurs spécifiques de la caspase 3 et des MAP kinases pour mieux comprendre comment ces protéines interagissent.

Des essais d'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de JNK et de ERK ont été faits mais il n'a pas été possible d'établir de conclusion du fait de la variabilité des résultats. La quantité de produit nécessaire pour les études *in vivo*, qui limite le nombre d'expérimentations, n'a pas permis une analyse statistique des données puisque nous n'avons pu réaliser que deux expérimentations aux résultats contradictoires. Un autre problème réside dans le fait que, même si les protéines de la cascade de signalisation intracellulaire sont très conservées, il n'est pas certain que les inhibiteurs commercialisés pour les mammifères, soient efficaces chez les invertébrés marins. Pour exemple, l'inhibiteur SB 203580 de p38, testé plusieurs fois au laboratoire, n'a pas eu d'effet chez l'éponge (Böhm et al., 2000). Comme pour les anticorps, c'est une autre difficulté à laquelle nous sommes confrontés lors de travaux consacrés aux invertébrés marins.

En revanche, l'un des constats de l'étude portant sur les MAPKs est l'intérêt de la p38 comme marqueur d'exposition à un polluant. Cette protéine est activée pour tous les composés testés (Kefaloyianni, 2005 ; Burlando et al., 2006 ; Damiani et al., 2009 ; Fabbri et al., 2009). Un autre constat est l'intérêt de l'apoptose comme biomarqueur d'effet (Micic et al., 2001; Fafandel et al., 2003) (Fig. 3).

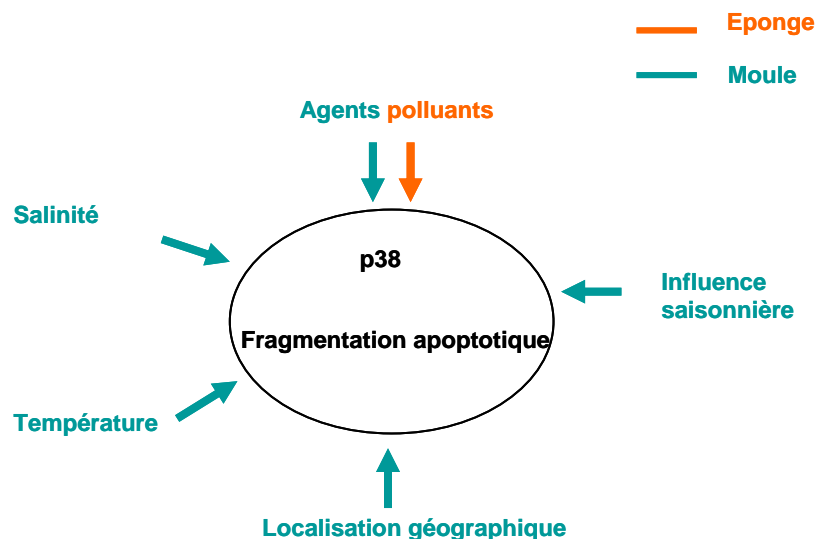


Fig. 3. Biomarqueurs à retenir au terme de cette étude

- Des données obtenues *in situ* pour l'étude de la voie de signalisation des MAPKs, il ressort :

- qu'il est nécessaire d'évaluer, en conditions contrôlées, l'impact de xénobiotiques, seuls ou en association, non seulement en faisant varier les paramètres temps et concentrations, mais également la température et l'osmolarité, pour tenter de reproduire les conditions *in situ* ;
  - qu'un seul type d'analyse ne suffit pas car les animaux, comme nous le constatons pour la moule et l'éponge, peuvent, pour une même réponse, activer des voies différentes.
- Enfin, parmi les résultats à retenir au terme de ce travail, nous avons séquencé deux gènes chez la moule *M. galloprovincialis*, l'un codant pour JNK, l'autre pour ERK, dont les séquences sont très conservées.

Pour conclure, le travail qui nous a été confié, nous a permis d'aborder la toxicologie sous l'aspect moléculaire, d'apporter quelques éléments de réponse mais surtout d'ouvrir « des pistes », qui pourraient être suivies pour évaluer l'impact de polluants sur les animaux marins, estimer les limites de concentrations « acceptables », compatibles avec une réparation éventuelle de dommages qu'ils peuvent avoir occasionnés. Certains éléments de réponse à des questions que nous soulevons sur les interactions entre protéines de la voie de signalisation des MAPKs notamment, pourraient être acquis plus aisément par une approche *in vitro* d'autant que les modèles existent et que leur intérêt en toxicologie est validé pour l'éponge (pour exemple, Müller et al., 2009) comme pour les bivalves (pour exemple, Le Marrec-Croq et al., 1997 ; Pennec et al., 2002 ; 2004 ; Talarmin et Droguet et al., 2009).

## ANNEXE 1



## ANNEXE 2

## ANNEXE 3

## Apoptosis in the sponge *Suberites domuncula* exposed to pollutants

Châtel A.<sup>1,2\*</sup> and Talarmin H.<sup>1\*</sup>, Hamer B.<sup>3</sup>, Schröder, H.C.<sup>2</sup>, Müller W.E.G.<sup>2</sup>, Dorange G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 4326 Facteurs nerveux et structuration tissulaire, Institut de Synergie des Sciences et de la Santé, 22 avenue Camille Desmoulins, 29609 Brest cedex, France

<sup>2</sup>Institute for Physiological Chemistry, Johannes Gutenberg University, Duesbergweg 6, D-55099 Mainz, Germany

<sup>3</sup>Ruder Bošković Institute, Center for Marine Research, Laboratory for Marine Molecular Toxicology, Giordano Paliaga 5, HR-52210 Rovinj, Croatia

### Abstract

Until recently, marine sponges have rarely been used as bioindicators in assessment of environmental risks. In this study, stimulation of MAP kinase signaling pathway by several stimuli was investigated in the marine sponge *Suberites domuncula*. In response to hydrogen peroxide as positive control, tributyltin, and water soluble fraction of diesel oil, the activation of the three MAP kinases, p38, JNK and ERK, was evaluated using ELISA assay. In addition, DNA damage, measured by 2 techniques (Fast micromethod<sup>®</sup>, TUNEL) and caspase 3 activity were determined. Our results demonstrated that the sponge activated the MAPKs differently depending on the chemical tested. Indeed, TBT induced activation of p38 and JNK and diesel oil enhanced activation of ERK and p38; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced activation of p38 and ERK as indicated in the literature. The activation of one or the other MAPK was observed after 1h exposure and after 6h and 24h of recovery in seawater. Moreover, DNA fragmentation, measured by Fast micromethod<sup>®</sup>, was detected after sponge treatment with all chemicals. Apoptosis was triggered with all doses of TBT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and only high concentrations of diesel oil, assessed by caspase 3 activity determination and TUNEL assay. Results demonstrated the high response of the sponge *Suberites domuncula* signaling pathway to the chemicals tested. Mechanism of pollutant-induced apoptosis is discussed.

**Keywords:** Sponge, *Suberites domuncula*, pollution, biomarker, tributyltin, diesel oil, MAP kinases, DNA damage, apoptosis

## 1. Introduction

Sponges (Porifera) constitute the most dominant animal phylum found in the marine hard-substrate benthos (Sara and Vacelet, 1973). These organisms, present in sandy bottoms in the open sea as well as in harbours, are sessile filter feeders capable of accumulating substances dissolved or in suspension in the water. Therefore, sponges are exposed to harmful substances of both anthropogenic and natural origin. Since few years, it has been envisaged to use sponge as bioindicator of thermal stress (Müller et al., 1995), of exposure to detergents (Zahn et al., 1977), polychlorinated biphenyls (Efremova et al., 2002) and heavy metals (Batel et al., 1993).

In order to obtain a more integrated evaluation of the effects of pollutant exposure in biological systems, the use of biomarkers of cytotoxicity and genotoxicity has been introduced in monitoring programs. Different techniques have been employed with a general tendency to use, at least in a first time of investigations, cellular and molecular tools providing early warnings of physiological alterations in organisms exposed to environmental stress/pollution (Gundert-Remy et al., 2005). In this field, a promising area of investigation is cell signaling, the complex of mechanisms allowing the transduction of extra cellular stimuli into modulatory processes of cellular activities (Burlando et al., 2006). Exposure of cells to different stressors has been shown to activate proteins of the stress signaling cascade, and especially the mitogen-activated protein kinases (MAPKs). These proteins belong to a superfamily of protein Ser/Thr-kinases. They are important amplifying modules that can transduce stress signals into cellular responses (Kultz and Avila, 2001; Poonam et al., 2002; Ranganna et al., 2002). Three subfamilies have been extensively studied in mammalian models: extracellular signal-related kinases (ERK1/2), Jun amino-terminal kinases (JNK1/2/3), p38 (p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) and ERK5 that regulate a lot of physiological functions. P38 and JNK MAPKs have been shown to be activated by various stimuli (UV, osmotic shock, stress), whereas ERK1/2 is activated by mitogens and growth factors. The balance between the activation/phosphorylation of these proteins and the cell type define the final cellular response which can lead to apoptosis. Indeed, although ERKs are mainly involved in mediating anabolic processes such as cell division, growth and differentiation, JNKs and p38-MAPKs are generally associated with cellular response to several stresses and can be involved in either anti-apoptotic or pro-apoptotic mechanisms, depending on their isoform and/or cell type

(Widmann et al, 1999; Kyriakis and Avruch, 2001; Roux and Blenis, 2004; Wada and Penninger, 2004).

In a previous study, Böhm et al. (2001) demonstrated that cells from *S. domuncula* exposed to lipopolysaccharides, in wall Gram- bacteria, responded with the activation of the stress activated p38 and JNK MAP kinases, without affecting the expression of the overall amount of these enzymes.

Apoptosis, or programmed cell death, is necessary for organism protection against multiple sources of threats. Signaling of apoptosis occurs through multiple independent pathways that are initiated either from triggering events within the cell or from outside the cell, for instance, by ligation of death receptors. But all these pathways converge on a common machinery cell destruction that is activated by a family of cysteine proteases (caspases) (Strasser et al., 2000). Caspases constitute a large protein family that is highly conserved among multicellular organisms. Experimental evidence has been presented that marine sponges, and especially *Geodia cydonium* and *S. domuncula*, undergo apoptosis during formation of the asexual reproduction bodies, the gemmules (Wagner et al., 1998) and also in response to environmental stress (Batel et al., 1993). Indeed, the caspase-like gene has recently been isolated from the sponge *S. domuncula* with high homology with human caspase 7 (Wiens et al., 2007) and caspase-3 like gene, from *G. cydonium* (Wiens et al., 2003). Major molecules known to regulate cell survival are the Bcl-2 and related cytoplasmic proteins. Bcl-2 has also been sequenced in the sponge *S. domuncula* and *G. cydonium*. These molecules are known to confer to human cells, resistance against environmental stress (Wiens et al., 2001).

Apoptosis finally lead to DNA fragmentation into <50-300 kb fragments and condensation of peripheral nuclear chromatin (Joza et al., 2001). This early form of nuclear condensation is referred to as “stage I” condensation (Susin et al., 2000). Endonuclease G also translocates to the nucleus where it cleaves nuclear chromatin to produce oligonucleosomal DNA fragments “stage II” (Li et al., 2001). Those fragments have a length varying between 180-200 bp. The fragmentation of chromosomal DNA is a hallmark of apoptosis (Aaij et Borst, 1972; Compton, 1992; Hale et al., 1996) and may facilitate apoptosis by terminating DNA replication and gene transcription (Arends et al., 1990). A DNA fragmentation factor (or DFF) has also been shown to play a role in DNA fragmentation (Liu et al., 1997).

In the present study, the effects of two substances, tributyltin and water soluble fraction of diesel oil have been evaluated on different levels of the sponge *S. domuncula* signaling pathway. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a positive control. P38, JNK and ERK MAP kinases activation were measured by an ELISA assay. DNA fragmentation was estimated by Fast micromethod<sup>®</sup> and apoptosis was assessed by measuring caspase 3 activity and TUNEL technique.

## 2. Materials and Methods

### *Organisms and investigated area*

Live specimens of the marine sponge *S. domuncula* (Porifera, Demospongiae, Hadromerida) were collected in the northern Adriatic sea near Rovinj (Croatia), and kept in aquaria in Mainz (Germany) at a temperature of 17°C.

### *Sponge treatments*

Sponges were cut into pieces of approximately 0.5 cm in length and put into 50 mL tubes containing hydrogen peroxide (30 % (w/w) H1009, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany), tributyltin (Sigma aldrich, Deisenhofen, Germany) or water soluble fraction (WSF) of diesel fuel diluted in sea water (SW), under aeration, at a temperature of 17°C. Incubations were performed for 1 h and then sponge samples were incubated in sea water for a recovery period of 6 h and 24 h. After treatment, samples were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### *Preparation of WSF of diesel oil*

1L of fresh Diesel fuel obtained from a filling station was mixed with 4L of artificial sea water, in accordance with Baden (1982) and stirred slowly for 24h, in order to enhance the dissolution of the water soluble components of the diesel oil. The mixture was then let for 3 hours before it was poured into separating funnels and allowed to stand overnight, in order to obtain a clean oil-water interphase. The WSF of the diesel oil, the layer on the bottom, was decanted into containers (Aflolabi et al., 1985).

### *Preparation of sponge total protein extract*

Sponges were homogenized in lysis-buffer (1x TBS [Tris-buffered saline], pH 7.5, 1 mM EDTA [Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid], 1% Nonidet-P40, 10 mM NaF [sodium fluoride], protease inhibitor cocktail [1 tablet/10 mL] (Complete Mini, Roche) and 1 mM sodium orthovanadate). After homogenization, a supernatant was obtained by centrifugation (13000 g / 10 min / 4°C) and stored at -20°C until analysis. Proteins concentrations were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

#### *Determination of the phosphorylation level of MAPK by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Flat-bottomed polystyrene 96-well Pro-Bind plates (Becton Dickinson, France) were covered with 20 µg/50 µL of total protein extract followed by 3h of coating at room temperature. After washing 3 times with phosphate buffered saline (PBS), containing 0.05% Tween-20 (PBS/T buffer), the plates were blocked with 3% bovine serum albumin in PBS (150 µL/well), overnight at 4°C. Level of each studied MAPK in the protein mixture bound to the plate was detected with polyclonal antibodies raised against the phosphorylated and the total form of p38, ERK (sc-7149, sc-17852, sc-154 and sc-7383, Santa Cruz Biotechnology, California) and JNK (9251S, 9252, Cell signaling Technology, Beverly Massachusetts). The antibodies were diluted 1:1000 in PBS/BSA 0.3% and incubated for 1 h. The immuno-complexes were detected using goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG, conjugated with horseradish peroxidase (1:10000; Sigma, Deisenhofen, Germany) under application of the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine [TMB] substrate (53-00-01, Medac GmbH, Germany). The reaction was stopped after an appropriate time (typically 10 min) by adding 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance was measured at 450 nm using Titertek MultiScan Plus microplate reader.

#### *Caspase-Glo 3/7 assay*

Caspase 3/7 activity in sponge tissue was measured using the Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 assay kit (Promega). Briefly, the pro-luminescent substrate containing the tetrapeptide sequence DEVD, is cleaved by caspase 3, which results in the release of aminoluciferin (a substrate for luciferase). After reaction with the luciferase, luminescent signal is produced and measured using a luminometer apparatus.

#### *Fast micromethod<sup>®</sup>*

Sponges (100 mg) were homogenized in 2 mL of 10% DMSO solution in TE buffer pH 7.4 (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl) under liquid nitrogen in a mortar with a precooled pestle. The pellets were collected in test tubes and stored at -80°C. The amount of DNA in dissolved sample aliquots was determined using a YOYO fluorochrome dye (Molecular Probes). Sample



homogenates were diluted with 10% DMSO in TE buffer in order to obtain a DNA concentration of 100 ng/mL. DNA integrity was analysed within 3 min by the Fast Micromethod<sup>®</sup> applied according to Batel et al. (1999). The method is based on the ability of the specific fluorochrome dye PicoGreen (Molecular Probes) to make a very stable complex with dsDNA (Cosa et al., 2001) in highly alkaline conditions instead of ssDNA. Sponge homogenates were lysed first, upon which the interaction between dye and DNA occurred. NaOH solution was added initiating the alkaline denaturing of dsDNA, while at the same time the reduction of the dsDNA-PicoGreen complex was followed by fluorometry. DNA denaturing was followed directly, for 20 min, in the microplate by measuring fluorescence (excitation 485 nm/emission 520 nm) using a Fluoroscanner Ascent (LabSystems, Finland). Results were calculated after 5 min of denaturing and expressed as strand scission factors (SSFs) as a value for DNA integrity.

#### *TUNEL assay*

Pieces of sponge were fixed in isopentane and frozen in liquid nitrogen before performing 8µm cryo-sections. After defreezing the sections for 30 min at room temperature, they were fixed in 4% formaldehyde for 20 min. Sections were washed with PBS and incubated with permeabilization solution (0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate) for 2 min at 4°C. Following PBS washes, the procedure was realized according to *In situ* cell death detection kit, Fluorescein (ROCHE). Briefly, sections were incubated with the TUNEL mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) from calf thymus and fluorescein-dUTP) for 1 h at 37°C. After washes in PBS, sections were mounted and analyzed under a fluorescent microscope.

In parallel, In order to get an histological view of the structure of sponge, , slides were stained with hemalun (Gabe, 1969) for 3 min. After washing in running water for 2 min, sections were incubated with water containing lithium carbonate in order to color the nuclei in blue. After treatment with 70° ethanol for 3 min, cytoplasm was colored with eosin for 2 min. After 3 baths of water and 3 baths of 95° ethanol for 5 min, followed by absolute ethanol, mounting was realized using Eukitt medium.

#### *RNA extraction, RT-PCR and PCR analysis of cyclin D1*

Total RNA of control sponges or sponges stimulated with pollutants, was extracted using TRIzol Reagent as described earlier (Gebenjuk et al., 2002). First strand cDNA synthesis was carried out

on 1 µg of total RNA extract with oligo-dT primers according to Improm II Reverse Transcriptase kit (Promega).

Human cyclin D1 primers 5' AGCTCGAGCCATGGAACACCAGCTCC 3' and 5' CCTGGTACCCTCAGATGTCCACGTCC 3' were used for PCR reaction, in order to have information concerning the proliferation state of the sponge.

#### *Statistical analysis*

Results of the sponge exposure experiments are given as mean±S.D. of 3 sponges, if not differently noted. The measured values were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey post hoc test. Statistical significance was accepted at a  $P < 0.05$  throughout (\*),  $P < 0.01$  throughout (\*\*) and  $P < 0.001$  throughout (\*\*\*).

### **3. Results**

#### **3.1. Effect of $H_2O_2$**

##### **3.2.1. MAPK activation**

Exposure with  $H_2O_2$  0.222 mmol/L induced an increase in pp38 levels after 1h, followed by a stabilization at 6h, then by a decrease after 24 h (Fig. 1).

On the contrary, the two other doses enhanced activation after 1h exposure, followed by a re-activation of p38 after 6h of recovery for 0.666 mmol/L whereas levels were maintained for 2 mmol/L. After 24h, pp38 levels were maintained.

Concerning JNK, no significant activation was observed at any time points and doses used.

Regarding pERK values, exposure with 0.222 mmol/L and 2 mmol/L enhanced its activation after 1h, followed by a decrease in the levels thereafter. But levels were still higher than for the control. Sponge treatment with 0.666 mmol/L induced a later activation of ERK at 6h, which was maintained at 24h.

##### **3.2.2. Caspase 3/7 activity**

Study of caspase 3/7 activity showed that treatment with  $H_2O_2$  0.222 mmol/L enhanced a progressive increase of the enzyme activity until 24h. The same profile of activity was observed for a concentration of 0.666 mmol/L, but unlike for the previous dose, level of activity tended to decrease at 24 h. On the contrary, exposure with 2 mmol/L reached maximum caspase 3/7 activity after 1h, but levels decreased at 6 and 24h (Fig. 2).

### **3.2.3. DNA integrity/damage**

The occurrence of DNA single-stranded breaks in sponge samples treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined using a microplate assay, which measures the unwinding of DNA under alkaline conditions using the fluorescent dye PicoGreen (Müller et al., 1997). Figure 3 shows that the number of DNA breaks, expressed as strand scission factor (SSF), strongly increased after 1 h exposure to 0.666 and 2 mmol/L in a dose-dependent manner. Nevertheless, the trend was progressively reversed at 6 and 24 h. Treatment with 0.222 mmol/L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not induced DNA damage.

Slides, colored with hemalun/eosin, with the aim to understand sponge histological structure, showed abundant spicules, which form the skeleton of the sponge. Cluster of cells were surrounding a canal (Fig. 10).

TUNEL technique was then performed in order to detect DNA damage due to apoptosis. We selected the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that enhanced high DNA damage at 1h followed by a recovery at 6 h and 24 h to study if the decrease in levels of DNA sb damage is due to DNA repair or to apoptosis. After section incubation in a mixture containing a fluorescent dye, which binds to apoptotic DNA breaks, results showed the presence of abundant fluorescent spots in sections of sponge treated with 2 mmol/L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h, compared to control (Fig. 11, 2), indicating apoptosis induction. Moreover, it could be noticed that the reactivity is confined to a cluster of neighbouring cells while other areas remained unstained.

## **3.2. Effect of TBT**

### **3.1.1. MAPK activation**

As illustrated in figure 4, pp38 levels were enhanced after 1h exposure with tested TBT concentrations. In addition, it could be noticed that the highest dose of TBT induced the slightest activation of p38. After 6h and 24h of recovery in SW, sponges maintained their high level of pp38, indicating that animals did not recover to basal level.

In the same manner, JNK was activated after 1h exposure with all concentrations of TBT but this effect was not dose-dependent. Levels remained high after exposure with 33 µg/L followed by 6h

of recovery in SW. However, for the other concentrations, a decline of pJNK levels was observed after 6 and 24h in SW.

On the contrary, pERK levels did not show any modification of the activation following TBT exposure at any time and dose used.

### **3.1.2. Caspase 3/7 activity**

Results depicted an induction of caspase 3/7 activity when sponges were incubated with 33 µg/L for 1h and after 6h of recovery in SW, followed by a decrease in the level at 24 h. Exposure with 100 µg/L induced the highest activity of the enzyme, with constant level for the three times tested. Exposure with 300 µg/L enhanced an activation after 1h which remained elevated for 6 h and 24 h of recovery in sea water (Fig. 5).

### **3.1.3. DNA integrity/damage**

Results of the Fast micromethod<sup>®</sup> showed that 33 µg/L TBT exposure triggered DNA damage after 1h, followed by a recovery after 6h and a return to the basal level after 24h. Concerning the two highest concentrations of TBT tested, a strong effect was observed at 24h after 100 µg/L TBT exposure. Nevertheless, no effect was detectable for an incubation of 300 µg/L (Fig. 6).

The only concentration chosen for analysis of TBT effect with the TUNEL technique (33 µg/L for 1 h), because it showed high DNA damage followed by a recovery period, provoked a strong fluorescence in the sections of sponges, compared to control (Fig. 11, 3).

## ***3.3. Effect of water soluble fraction of diesel oil***

### **3.3.1. MAPK activation**

As shown in figure 7, treatment with all concentrations of WSF of diesel oil induced an activation of p38 after 1h exposure, maintained at 6h. Concerning 3.25 and 15 % doses, p38 was re-activated after sponge incubation in SW for 24h, while for 7.5 and 30 %, levels were decreased or stabilized, respectively.

7.5% of diesel oil only enhanced JNK phosphorylation at 24h whereas for 15 %, the activation was detectable at 1h and was progressively reduced at 24h.

Levels of pERK were increased at 6h of recovery following exposure with 3.25 and 7.5 % whereas for 15 and 30 %, levels tended to decrease at this time (Fig. 7).

### **3.3.2. Caspase 3/7 activity**

While observing caspase 3/7 activity, it could be noticed that WSF of diesel oil induced a slight activity of this enzyme. Some of the conditions tested presented more activity than the others. Indeed, after 6 and 24h following sponge incubation with 15 % of diesel oil, results showed high activity of caspase 3/7 enzyme. Moreover, incubation with 30 % of diesel followed by 6 h of recovery in SW induced also its activation (Fig. 8).

### **3.3.3. DNA integrity/damage**

Fast micromethod<sup>®</sup> technique showed that treatment with diesel 3.25 % enhanced a high induction of DNAsb fragmentation at 1h which was reduced at 6 and 24h, evaluated by. The same profile was observed for a concentration of 7.5 %. This concentration enhanced a high level of DNA breaks after 1h. Exposure with 15 % of WSF of diesel oil showed a rapid induction of DNA breaks after 1h, increasing progressively through 6h SW recovery. However, at 24h, DNA integrity rate declined. Concerning the last concentration (30 %), levels of DNA damage were slightly induced for all time tested (Fig. 9).

TUNEL assay was performed on a section of sponge treated with 7.5 % of diesel for 1h, which reacted positively as shown by intense fluorescence (Fig. 11, 4).

### **3.4. Effect of pollutants on cyclin D1 expression**

Cyclin D1 expression was analyzed in order to evaluate if the fact that sponges have been cut for the incubations could set off proliferation mechanisms. Indeed, we could make the hypothesis that sponges could activate their proliferating system to rebuild a new sponge. Among the proteins implicated in this process, ERK is known to be involved in proliferation of numerous cell types.

Cyclin D1 expression, analysed in sponge pieces and let 1h, 6h and 24h in SW compared to sponge directly frozen, is presented in figure 12. It was noticed an increase in cyclin D1 expression after 6h and 24h in fragments of sponge, indicating a proliferating enhancement.

In addition, in order to detect a possible effect of the substances tested on this gene, cyclin D1 was measured in sponges treated with the lowest and highest doses for each chemical, and after 24 h of recovery in SW. For the highest doses (300 µg/L and 2 mmol/L) of TBT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, used as a control, a decrease in cyclin D1 expression was observed, compared to the lowest doses (33 µg/L and 0.222 mmol/L). On the contrary, no difference was detected following exposure with diesel oil.

#### **4. Discussion**

Because of the comparatively simple bauplan, the low organization level of sponges into tissue-like cell assemblages (Simpson, 1984) and the nonspecialization of the epithelial layers, these old animals might react strongly to environmental stressors (Wagner et al., 1998). So, these animals have to be taken in consideration in evaluation of new bioindicators.

Biomarkers provide evidence for adaptation system by which organisms respond at molecular and cellular levels to pollutant quantities exceeding normal detoxification capacity (Wagner et al., 1998). In this field, proteins of the cell signaling appear to be suitable biomarkers as they give informations about the organism state in the early stages of contamination with a pollutant. Among them, the Mitogen-activated protein (MAP) kinases play a central role as they act as amplifying molecules that can transduce stress signals into cellular responses (Kultz and Avila, 2001; Poonam et al., 2002; Ranganna et al., 2002).

##### ***Effect of selected chemicals on MAP kinase signaling pathway***

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, used as positive control of MAPK induction (Zrouri et al., 2004), can produce apoptosis in the cells of most animals from protozoa to mammals (Palomba et al., 1999; Li et al., 2000; Das et al., 2001). It is known to enter in the cell compartment *via* ANC (anion-channel) diffusion. Our results showed that sponge treatment with 0.222 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced activation of JNK contrarily to the other concentrations, which activated p38 and ERK. These results are in correlation with some previous studies showing an activation of p38 and ERK after 1h exposure with low doses (5

$\mu\text{M}$  and  $10 \mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in mantle of *M. galloprovincialis* (Gaitanaki et al., 2003), in amphibian cells (Carter et al., 2002) and rat cardiomyocytes (Tu et al., 2003). Absence of activation of JNK for the high concentrations could be explained by the hypothesis of Masuda et al. (2003) who supposed that activation of ERK may induce phosphorylation of a MAPK phosphatase 7 (MKP-7) which preferably inactivates JNK. In addition, it has also been demonstrated that overexpression of Hsp70 can inhibit JNK activation by  $\text{H}_2\text{O}_2$  through a mechanism involving the direct binding of Hsp70 to JNK (Park et al., 2001).

$\text{H}_2\text{O}_2$  has been commonly used as positive control for genotoxicity in many studies (Singh et al., 1988; Kruszewski et al., 1994). This compound causes base modifications directly, particularly following the Fenton reaction to form the highly reactive hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ) which reacts with DNA by addition to double bonds of DNA bases (Sonntag, 1987; Halliwell and Aruoma, 1991). Fast micromethod<sup>®</sup> technique, which detects single-stranded DNA breaks, alkaline labile sites and incomplete excision repair (Jaksic and Batel, 2003), showed a decrease in DNA integrity for all doses of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Moreover, the highest DNA damage level was observed at 1 h exposure to  $2 \text{ mmol/L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which was followed by a diminution of DNA damage at 6 h and 24 h. This decrease could be explained by two mechanisms : DNA alteration was repaired by cells or cells underwent apoptosis.

The very sensitive TUNEL method, showed a positive reaction in the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated sponge, as compared to control sponges. An increase in the caspase 3 activity for all time and concentrations tested was also observed. So, we could make the hypothesis that firstly, cells tried to repair DNA alterations and then, induced apoptosis if the damages were too significant, as observed in this study.

Liu et al. (1997) identified a DNA fragmentation factor (or DFF), composed of DFF 40 and 45, capable of causing chromosomal DNA fragmentation in the presence of an activated caspase 3. In the sponge model, upon activation of apoptosis, DFF45 could be cleaved by caspase 3 and dissociated from DFF40 as demonstrated by Liu et al., 1997 and Nagata (2000). Free DFF40 could be able to cleave DNA into oligonucleosomal size fragments, for induction of apoptosis (Zhang and Xu, 2000).

Therefore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, used as positive control in our study, gave expected results comparing data of the literature. Indeed, it activated MAPK proteins and induced apoptosis. Such data validated our experimental methods before evaluation of the effects of two types of marine pollutants that we tested.

**Tributyltin**, a lipophilic organotin compound, was used in high quantities for wood preservation, antifouling paints, disinfection of circulating industrial water, and slime control in paper mills (Kannan et al., 1998; Karpiak et al., 2001). Thus, widespread and significant pollution of marine and freshwater environments with TBT is reported in water (Shim et al., 2005), sediments (Harino et al., 2006; 2007) and aquatic organisms (Dorneles et al., 2008; Harino et al., 2008). Our results showed that TBT concentrations varying between 33 and 300 µg/L induced only p38 and JNK. Yu et al. (2000) demonstrated in human T cell line, that 1 µM TBT induced Ca<sup>2+</sup> mobilization for MAPK phosphorylation from 15 min exposure to 4h. In our study, it was observed that MAP kinase activation was still high after 6h and 24h of recovery in SW. Gaitanaki et al. (2004) suggested that in the mantle of *M. galloprovincialis*, the substrates of p38 MAPK are located in the cytoplasmic rather than in the nuclear compartment. Thus, the MAPK may be re-activated by their upstream or downstream substrates (Kyriakis, 1996), explaining the persistence of phosphorylation after 6 and 24h of recovery, as observed in this study for *S. domuncula*.

However, our results did not show any effect of TBT on ERK activity. Damiani et al. (2009) noticed on ascidian embryos that TBT treatment induced a slight decrease in ERK 1/2 activation for similar concentrations as the doses used in the present study whereas very high concentrations (up to 10 µM) induced a stronger diminution of its phosphorylation, indicating that, at these concentrations, TBT exposures caused an inhibition of ERK phosphorylation.

TBT has been shown to have genotoxic effects as it modulates DNA methylation, which has a role in gene expression (Wang et al., 2009). Moreover, it induces high amount of ROS in the cells which has a direct effect on DNA as it incorporates base adducts (Sonntag, 1987). DNA fragmentation detected by Fast micromethod<sup>®</sup> represented consequently, the reparation enhanced by the cell. Results obtained by this technique showed induction of DNA breaks after 1h exposure with 33 µg/L and after 24 h of recovery following exposure with 100 µg/L of TBT.



Previous study of Batel et al. (1993) demonstrated in the sponge *G. cydonium*, that TBT exposure enhanced DNA damage (measured by the same technique) as well as Hsp70 expression, which could be an activator of p38 and JNK MAPKs. Moreover, Fafandel et al. (2003) showed that sponge exposure to TBT resulted in alteration of KRS protein kinase (a stress-responsive protein serine/threonine kinase) expression and phosphorylation rate, and demonstrated that this protein was involved in promotion of apoptosis.

Indeed, we demonstrated that apoptosis was induced in the sponge treated with all doses of TBT, since caspase 3 activity was detected and TUNEL assay showed positive reactivity of the sections. Batel et al. (1993) showed that sponge exposure to TBT (> 1µM) provoked apoptotic DNA fragmentation. TBT (250ng/g-5µg/g) also induced apoptosis in the mussel *M. galloprovincialis* (Micic et al., 2001, 2002). Moreover, Owuor et al. (2002) showed a relationship between JNK and caspase 3 in rainbow trout cells treated with TBT, which is in agreement with our results.

**Polycyclic aromatic hydrocarbons** (PAH) are environmental pollutants formed during incomplete combustion of organic material. They are introduced in the environment from a variety of sources including forest fires, volcanic eruptions, diesel, tobacco (White et al., 1994; Phillips et al., 1984). PAH, as lipophilic molecules, are metabolized by the cytochrome P450 monooxygenase family (CYP1). Consequences of this, are the formation of highly reactive metabolites which form DNA adducts (Pelkonen et al., 1982). The CYP1A1-dependent metabolism leads to an early production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Results of this study first revealed that sponge exposure with WSF of diesel oil enhanced activation of all three MAP kinases studied. Moreover, it could be noticed that ERK was activated more strongly with this pollutant, compared to the other used.

In hepatoma cells, benzo{a}pyrene, also present in the WSF of diesel oil, has been shown to affect the MAPK transduction pathway characterized by phosphorylation of both p38 and ERK1/2 in human (Chen et al., 2003) and c-jun N-terminal kinase 1 in mouse (Lei et al., 1998) while isomers of anthracene had opposite effect depending on their structure on ERK 1/2 activation (Rummel et al., 1999).

At low dose (3.25 %), cells are capable to excise DNA adduct, forming high level of DNA breaks, measured by Fast micromethod, without triggering apoptotic process, since caspase 3 activity was not detected. The excision repair gene homolog (XPB/ERCC-3) was isolated from the

sponge *G. cydonium* (Batel et al., 1998). In human, this gene is coding for an helicase, involved in the early step of the DNA excision repair (Sancar, 1996). Moreover, ERK was activated with this treatment, which has an anti-apoptotic role in numerous cell types (Luchetti et al., 2009). This is in agreement with the study of Micic et al. (2002) who showed that in the mussel, concentrations varying between 5 to 20 µg/g of benzopyrene provoked DNA breaks, without apoptosis. At the other doses, amount of adducts were higher and the cell was not able to excise them, as showed by low level detected with Fast micromethod<sup>®</sup>, and as a consequence, apoptosis occurred, characterized by high caspase 3 activity, reactivity in TUNEL assay and p38 activation.

### ***Effect of incubation conditions on sponge proliferating system***

Sponges possess a characteristic that they are able to proliferate indefinitely. High level of telomerase activity has been found in almost all cells of metazoan (Kozioł et al., 1998). For the studies, sponge have been cut into pieces to perform exposures to the selected chemicals. However, it was suggested that this physical process could set off mechanisms of proliferation in order to rebuild a new organism. ERK appeared for many cells to pass the G1 restriction point and to enter the S-phase (Pages et al., 1993).

Expression of the D-type cyclins, which are the regulatory subunits for the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK6 catalytic subunits, controls the early stages of the transition toward the S-phase. A critical link between those proteins and the proteins of the ERK cascade has been highly suggested. Indeed, the expression of dominant inhibitory active mutants of MEK and ERK has been showed to inhibit cyclin D1 expression (Lavoie et al., 1996). Our results showed that after 6h and 24h in SW, cyclin D1 expression in sponge pieces was enhanced, confirming the progression in the cell cycle, thus explaining high levels of pERK in control sponges incubated in SW for 6h and 24h of recovery. Moreover, we detected a basal level of cyclin D1, which may due to asynchronous mitotic cells in sponge tissue.

As a consequence, this increase in pERK levels has to be taken in consideration in interpretation of the results.

Moreover, expression of this gene has been evaluated in sponge treated with TBT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results showed that highest concentrations of TBT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibited cell cycle progression whereas no significant effect was notable after diesel oil exposure, probably because DNA

damage caused by this chemical are not enough important for the sponge to stop its proliferating system.

### ***Apoptosis signaling pathway triggered by the tested chemicals in *Suberites domuncula****

Agents which cause apoptosis also induced *in fine* DNA damage. Thus, DNA is the main target of environmental pollutants (e.g. alkylating compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons, biphenyls), physical stress (UV, temperature, salinity, osmolarity, pH). Two cellular strategies are evolved by the cell to cope with this effect *i*) DNA is repaired *ii*) cells that lead to DNA damages are removed from the tissue by death (Roos and Kaina, 2006). An important aspect of DNA-damaging agents is that they also provoke alterations to other cellular components, leading to activation of cell signaling cascades including the mitogen-activated protein (MAP)-kinase pathway.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBT and diesel oil are known to enter into the cell in different manner (passive diffusion for TBT and diesel oil) and active diffusion for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (anion channel) (Fig. 14). The common effect of TBT and diesel oil is that they generate ROS (reactive oxygen species) and especially H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the cell. ROS produces base oxidation. However, those pollutants have different effects : diesel has been shown to produce DNA damage with addition of DNA adducts and TBT activates apoptotic pathways, through mitochondria.

MAP kinases are known to phosphorylate p53 on multiple amino acid residues that enhance p53 stabilization (Bulavin et al., 1999 ; Huang et al., 1999). In some cell types, p53 activation triggers apoptosis (Choi et al., 2000 ; Lee et al., 2000), while in other cell types, p53 protein displays a protective function, attributable not only to its role in the control of cell cycle checkpoints, but also to the enhancement of DNA repair (Ko and Prives 1996 ; Giaccia and Kastan, 1998 ; Prives and Hall, 1999). Homologue of the p53 family has also been described in mollusk (Banni et al., 2009). Most recently, gadd45, implicated in the repair, has been identified as one of the gene regulated by p53 (Smith et al., 2000). P53 has been reported to be involved in reparation of DNA adducts (by nucleotide excision repair NER pathway) as well as in base damage (by base excision repair BER pathway) (Seo and Jung, 2004).

So, the DNA damage detected by Fast micromethod<sup>®</sup> is only characteristic of a repair by excision. TBT lead to apoptosis at all time and doses tested while diesel was not toxic for the lowest concentration. In parallel, MAPK signaling transduction pathway is differentially enhanced,

depending on the chemical. ERK was associated with anti-apoptotic mechanism at low dose of diesel whereas JNK and p38 induced apoptosis, as in agreement with data of the literature.

Here we showed that the sponge *Suberites domuncula* utilizes the MAPK as a selective signaling pathway in response to environmental stresses. This work has shown the interest of using the sponge as a target animal to study cytotoxicity and genotoxicity of xenobiotics. Our conclusions are in agreement with what was previously demonstrated (Müller and Müller, 1998; Schröder et al., 1999). Marine sponges are potentially good bioindicators, and could be used in complementary with other filtrating organisms like the oyster or the mussel, in monitoring programs for assessment of water quality.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the the Bundesministerium für Bildung und Forschung (project 03F0451: cooperation project WTZ BRA – Health of marine ecosystems, and Center of Excellence *BIOTEC*marin), the Bundesministerium für Bildung und Forschung Germany (project “Center of Excellence *BIOTEC*marin”) and the International Human

Frontier

Science

Program

(RG-333/96-M).

- Aaij, C., Borst, P. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 269, 192-200.
- Arends, M. J., Morris, R. G., Wyllie, A. H. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608.
- Batel, R., Fafandjel, M., Blumbach, B., Schröder, H. C., Hassanein, H. M., Müller, I. M., Müller, W. E. 1998. Expression of the human XPB/ERCC-3 excision repair gene-homolog in the sponge *Geodia cydonium* after exposure to ultraviolet radiation. *Mutat. Res.* 409, 123-133.
- Batel, R., Jaksic, Z., Bihari, N., Hamer, B., Fafandel, M., Chauvin, C., Schröder, H. C., Müller, W. E., Zahn, R. K. 1999. A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod). *Anal. Biochem.* 270, 195-200.
- Batel, R., Vukmirovic, M., Bihari, N., Zahn, R. K., Müller, W. E. 1993. Nonradiometric detection of DNA crosslinks in mussel hemolymph by alkaline elution. *Anal. Biochem.* 212, 402-406.
- Böhm M., Hentschel U., Friedrich A., Fieseler L., Steffen R., Gamulin V., Müller I.M., Müller W.E.G., 2001. Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Mar. Biol.*, 139:1037–1045.
- Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E., Fornace, A. J., Jr. 1999. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.* 18, 6845-6854.
- Burlando, B., Berti, E., Viarengo, A. 2006. Effects of seawater pollutants on protein tyrosine phosphorylation in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 78 Suppl 1, S79-85.
- Carter, L. A., Tabor, M. B., Bonner, J. C., Bonner, L. A. 2002. Mitogen-activated protein kinase activation by oxidative and bacterial stress in an amphibian cell culture model. *Environ. Health Perspect.* 110, 641-645.
- Chen, S., Nguyen, N., Tamura, K., Karin, M., Tukey, R. H. 2003. The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 19526-19533.
- Compton, M. M. 1992. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev.* 11, 105-119.
- Cosa, G., Focsaneanu, K. S., McLean, J. R., McNamee, J. P., Scaiano, J. C. 2001. Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochem. Photobiol.* 73, 585-599.
- Das, M., Mukherjee, S. B., Shaha, C. 2001. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Cell Sci.* 114, 2461-2469.
- Damiani F., Gianguzza M., Dolcemascolo G., 2009. Effects of tributyltin chloride in ascidian embryos: modulation of kinase-mediated signalling pathways. *I. S. J.* 6, 87-94.

Efremova, S. M., Margulis, B. A., Guzhova, I. V., Itskovich, V. B., Lauenroth, S., Müller, W. E., Schröder, H. C. 2002. Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant. *Aquat. Toxicol.* 57, 267-280.

Fafandel M., Müller W.E.G., Batel R. 2003. Molecular response to TBT stress in marine sponge *Suberites domuncula*: proteolytical cleavage and phosphorylation of KRS\_SD protein kinase. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 297 : 239-252.

Gaitanaki, C., Kefaloyianni, E., Marmari, A., Beis, I. 2004. Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Mol. Cell. Biochem.* 260, 119-127.

Gaitanaki, C., Konstantina, S., Chrysa, S., Beis, I. 2003. Oxidative stress stimulates multiple MAPK signalling pathways and phosphorylation of the small HSP27 in the perfused amphibian heart. *J. Exp. Biol.* 206, 2759-2769.

Giaccia, A. J., Kastan, M. B. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 12, 2973-2983.

Gundert-Remy, U., Dahl, S. G., Boobis, A., Kremers, P., Kopp-Schneider, A., Oberemm, A., Renwick, A., Pelkonen, O. 2005. Molecular approaches to the identification of biomarkers of exposure and effect--report of an expert meeting organized by COST Action B15. November 28, 2003. *Toxicol. Lett.* 156, 227-240.

Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E., Longthorne, V. L., Culhane, A. C., Williams, G. T. 1996. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* 236, 1-26.

Halliwell, B., Aruoma, O. I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281, 9-19.

Huang, C., Ma, W. Y., Maxiner, A., Sun, Y., Dong, Z. 1999. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* 274, 12229-12235.

Jaksic, Z., Batel, R. 2003. DNA integrity determination in marine invertebrates by Fast Micromethod. *Aquat. Toxicol.* 65, 361-376.

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G., Penninger, J. M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.

Kannan, K., Villeneuve, D. L., Blankenship, A. L., Giesy, J. P. 1998. Interaction of tributyltin with 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced ethoxyresorufin O-deethylase activity in rat hepatoma cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 55, 373-384.

- Karpiak, V. C., Bridges, R. J., Eyer, C. L. 2001. Organotins disrupt components of glutamate homeostasis in rat astrocyte cultures. *J. Toxicol. Environ. Health A* 63, 273-287.
- Ko, L. J., Prives, C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10, 1054-1072.
- Koziol, C., Borojevic, R., Steffen, R., Müller, W. E. 1998. Sponges (*Porifera*) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech. Ageing Dev.* 100, 107-120.
- Kruszewski, M., Green, M. H., Lowe, J. E., Szumiel, I. 1994. DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4 degrees C and 37 degrees C in L5178Y sublines. *Mutat. Res.* 308, 233-241.
- Kultz, D., Avila, K. 2001. Mitogen-activated protein kinases are in vivo transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 821-829.
- Kyriakis, J. M., Avruch, J. 1996. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* 271, 24313-24316.
- Kyriakis, J. M., Avruch, J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807-869.
- Lei, W., Yu, R., Mandlekar, S., Kong, A. N. 1998. Induction of apoptosis and activation of interleukin 1beta-converting enzyme/Ced-3 protease (caspase-3) and c-Jun NH2-terminal kinase 1 by benzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 58, 2102-2106.
- Li, J., Huang, C. Y., Zheng, R. L., Cui, K. R., Li, J. F. 2000. Hydrogen peroxide induces apoptosis in human hepatoma cells and alters cell redox status. *Cell. Biol. Int.* 24, 9-23.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Luchetti, F., Betti, M., Canonico, B., Arcangeletti, M., Ferri, P., Galli, F., Papa, S. 2009. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 339-351.
- Micic, M., Bihari, N., Jaksic, Z., Müller, W. E., Batel, R. 2002. DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 53, 243-262.
- Micic, M., Bihari, N., Labura, Z., Muller, W. E., Batel, R. 2001. Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquat Toxicol* 55, 61-73.
- Nagata, S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell. Res.* 256, 12-18.
- Müller, W.E.G. (1995) Molecular phylogeny of Metazoa (animals): monophyletic origin. *Naturwiss.* 82:321-329.



Müller W.E.G., Müller I. 1996. Sponge cells and tissue as biological monitors of aquatic pollution. In : Wells P.G., Lee K., Blase C. Microscale aquatic toxicology – advances, techniques and practice. CRC Lewis Publishers, Boca Raton.

Owuor, E. D., Kong, A. N. 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 64, 765-770.

Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., Pouyssegur, J. 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8319-8323.

Palomba, L., Sestili, P., Columbaro, M., Falcieri, E., Cantoni, O. 1999. Apoptosis and necrosis following exposure of U937 cells to increasing concentrations of hydrogen peroxide: the effect of the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1743-1750.

Park, J., Liu, A. Y. 2001. JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response. *J. Cell. Biochem.* 82, 326-338.

Pelkonen, O., Nebert, D. W. 1982. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34, 189-222.

Phillips, D. H., Grover, P. L. 1984. Biologically-active and chemically-reactive polycyclic hydrocarbon metabolites. *IARC Sci. Publ.* 47-61.

Poonam, S., Paily, K. P., Balaraman, K. 2002. Oviposition attractancy of bacterial culture filtrates: response of *Culex quinquefasciatus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 359-362.

Prives, C., Hall, P. A. 1999. The p53 pathway. *J. Pathol.* 187, 112-126.

Ranganna, K., Yousefipour, Z., Nasif, R., Yatsu, F. M., Milton, S. G., Hayes, B. E. 2002. Acrolein activates mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways in rat vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 240, 83-98.

Roos, W. P., Kaina, B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* 12, 440-450.

Roux, P. P., Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320-344.

Rummel, A. M., Trosko, J. E., Wilson, M. R., Upham, B. L. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junctional intercellular communication and stimulated MAPK activity. *Toxicol. Sci.* 49, 232-240.

Sancar, A. 1996. DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 43-81.

Sarà, M. and Vacelet, J. 1973. Écologie des démosponges. In *Traité de Zoologie, Tome III: Spongiaires* (ed. P. P. Grassé), pp.462 -576. Paris: Masson et Cie.

Schröder, H. C., Hassanein, H. M., Lauenroth, S., Koziol, C., Mohamed, T. A., Lacorn, M., Steinhart, H., Batel, R., Müller, W. E. 1999. Induction of DNA strand breaks and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 47-55.

Seo, Y. R., Jung, H. J. 2004. The potential roles of p53 tumor suppressor in nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER). Exp. Mol. Med. 36, 505-509.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res. 175, 184-191.

Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C. X., Hanawalt, P. C., Fornace, A. J., Jr. 2000. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. Mol. Cell. Biol. 20, 3705-3714.

Simpson T.L., 1984. The cell biology of sponges. Springer-Verlag, New York.

von Sonntag C. 1987. New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. Free Radic. Res. Commun. 2: 217-24.

Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. M. 2000. Apoptosis signaling. Annu. Rev. Biochem. 69, 217-245.

Tu, V. C., Bahl, J. J., Chen, Q. M. 2003. Distinct roles of p42/p44(ERK) and p38 MAPK in oxidant-induced AP-1 activation and cardiomyocyte hypertrophy. Cardiovasc. Toxicol. 3, 119-133.

Wada, T., Penninger, J. M. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 23, 2838-2849.

Wagner C., Steffen R., Koziol C., Batel R., Lacorn M., Steinhart H., Simat T., Müller W.E.G. 1998. Apoptosis in marine sponges: A biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). Mar. Biol. 131:411-421.

Wang, Y., Wang, C., Zhang, J., Chen, Y., Zuo, Z. 2009. DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastiscus marmoratus* liver. Aquat. Toxicol.

White K.L. Jr., Kawabata T.T., Ladics G.S., 1994. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon immunotoxicity. In: Dean JH, Luster MI, Munson AE, Kimber I, editors. Immunotoxicology and immunopharmacology. 2nd ed. New York: Raven Press. pp 123-142.

- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143-180.
- Wiens, M., Diehl-Seifert, B., Müller, W. E. 2001. Sponge Bcl-2 homologous protein (BHP2-GC) confers distinct stress resistance to human HEK-293 cells. *Cell. Death Differ.* 8, 887-898.
- Wiens, M., Korzhev, M., Perovic-Ottstadt, S., Luthringer, B., Brandt, D., Klein, S., Müller, W. E. 2007. Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (demospongiae: Porifera). *Mol. Biol. Evol.* 24, 792-804.
- Wiens, M., Krasko, A., Perovic, S., Müller, W. E. 2003. Caspase-mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1593, 179-189.
- Yu, Z. P., Matsuoka, M., Wispriyono, B., Iryo, Y., Igisu, H. 2000. Activation of mitogen-activated protein kinases by tributyltin in CCRF-CEM cells: role of intracellular Ca(2+). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 200-207.
- Zahn, R. K., Zahn, G., Muller, W. E., Müller, I., Beyer, R., Müller-Berger, U., Kupelec, B., Rijavec, M., Britvic, S. 1977. Consequences of detergent pollution of the sea: effects on regenerating sponge cubes of *Geodia cydonium*. *Sci. Total Environ.* 8, 109-151.
- Zhang, J. H., Xu, M. 2000. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res.* 10, 205-211.
- Zrouri, H., Le Goascogne, C., Li, W. W., Pierre, M., Courtin, F. 2004. The role of MAP kinases in rapid gene induction after lesioning of the rat sciatic nerve. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1811-1818.

**Fig. 1.** Effect of different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations on MAPK activation in the sponge *S. domuncula*. Protein extracts from control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated sponges were subjected to ELISA analysis using antibodies directed against the phosphorylated and the total forms of p38, JNK and ERK MAPK. Results are given as the percentage of phosphorylated MAPK compared to total form of the enzyme. (\*) and (#) : data significantly different compared to control.

**Fig. 2.** Caspase 3/7 activity in the sponge *S. domuncula* exposed to different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1h and after 6h and 24h of recovery in SW. (\*) : data significantly different compared to control.

**Fig. 3.** DNA damage of *S. domuncula* exposed to different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1h and after 6h and 24h of recovery in SW (Fast Micromethod<sup>®</sup>). (\*) : data significantly different compared to control.

**Fig. 4.** Effect of different TBT concentrations on MAPK activation in the sponge *S. domuncula*. Protein extracts from control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated sponges were subjected to ELISA analysis using antibodies directed against the phosphorylated and the total forms of p38, JNK and ERK MAPKs. Results are given as the percentage of phosphorylated MAPK compared to total form of the enzyme. (\*) and (#) : data significantly different compared to control.

**Fig. 5.** Caspase 3/7 activity in the sponge *S. domuncula* exposed to different concentrations of TBT for 1h and after 6h and 24h of recovery in SW. (\*) : data significantly different compared to control.

**Fig. 6.** DNA damage of *S. domuncula* exposed to different concentrations of TBT for 1h and after 6h and 24h of recovery in SW (Fast Micromethod<sup>®</sup>). (\*) : data significantly different compared to control.

**Fig. 7.** Effect of different concentrations of diesel oil water soluble fraction on MAPK activation within the sponge *S. domuncula*. Protein extracts from control and WSF-treated sponges were subjected to ELISA analysis using antibodies directed against the phosphorylated and the total forms of p38, JNK and ERK MAPK. Results are given as the percentage of phosphorylated MAPK compared to total form of the enzyme. (\*), (+) and (#) : data significantly different compared to control.

**Fig. 8.** Caspase 3/7 activity in the sponge *S. domuncula* exposed to different concentrations of WSF of diesel oil for 1h and after 6h and 24h of recovery in SW. (\*) : data significantly different compared to control.

**Fig. 9.** DNA damage of *S. domuncula* exposed to different concentrations of WSF of diesel oil for 1h and after 6h and 24h of recovery in SW (Fast Micromethod<sup>®</sup>). (\*) : data significantly different compared to control.

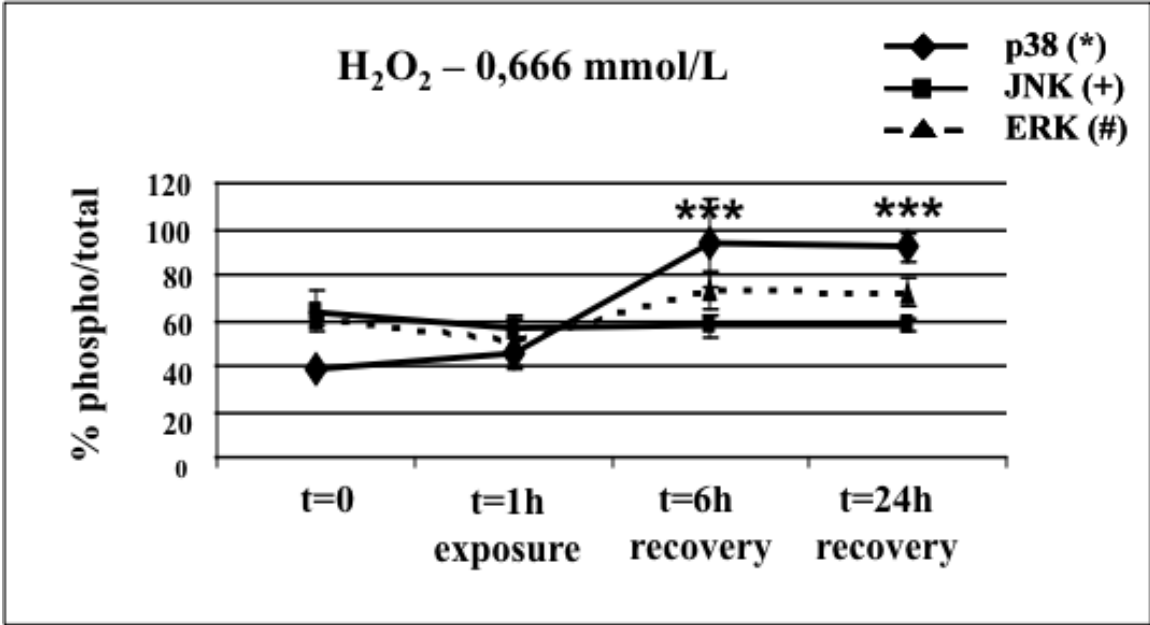
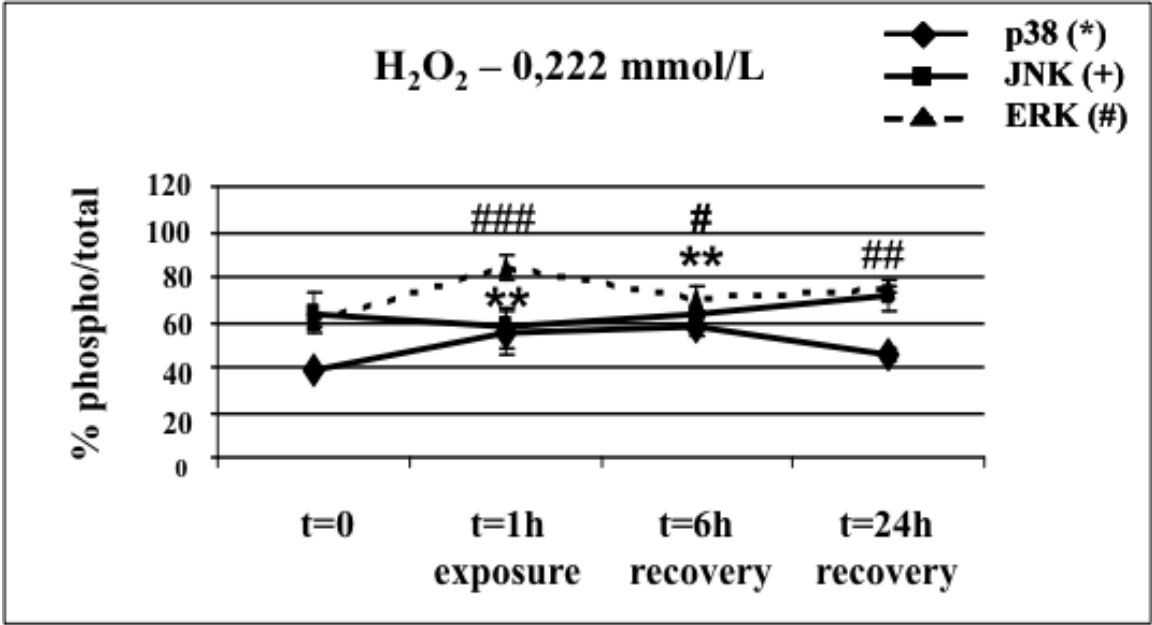
**Fig. 10.** Histological structure (hemalun/eosin) of sponge. c : cells, s : spicules and ca : canal.

**Fig. 11.** TUNEL stained transverse section across *Suberites domuncula* control (1), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - treated (2 mmol/L for 1h) (2), TBT-treated (33 µg/L for 1h) (3), diesel-treated (7.5 % for 1h) (4).

**Fig. 12.** Cyclin D1 expression in different conditions. **1**, TBT 33µg/L – 24h recovery; **2**, TBT 300 µg/L – 24h recovery; **3**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.222 mM – 24h recovery; **4**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM – 24h recovery; **5**, Diesel oil (DO) 3.25 % – 24h recovery; **6**, Diesel oil (DO) 30 % – 24h recovery; **7**, control t=0; **8**, control t=1h in SW; **9**, control t=6h in SW; **10**, control t=24h in SW.

**Fig. 13.** Hypothetical model of activation of MAP kinase pathway in the sponge *S. domuncula* after exposure with TBT, diesel oil and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. All substances induced DNA damage and production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This latter activated MAP kinases which lead to apoptosis *via* caspase 3 activation, and reduction of cyclin D1 expression.

Fig. 1



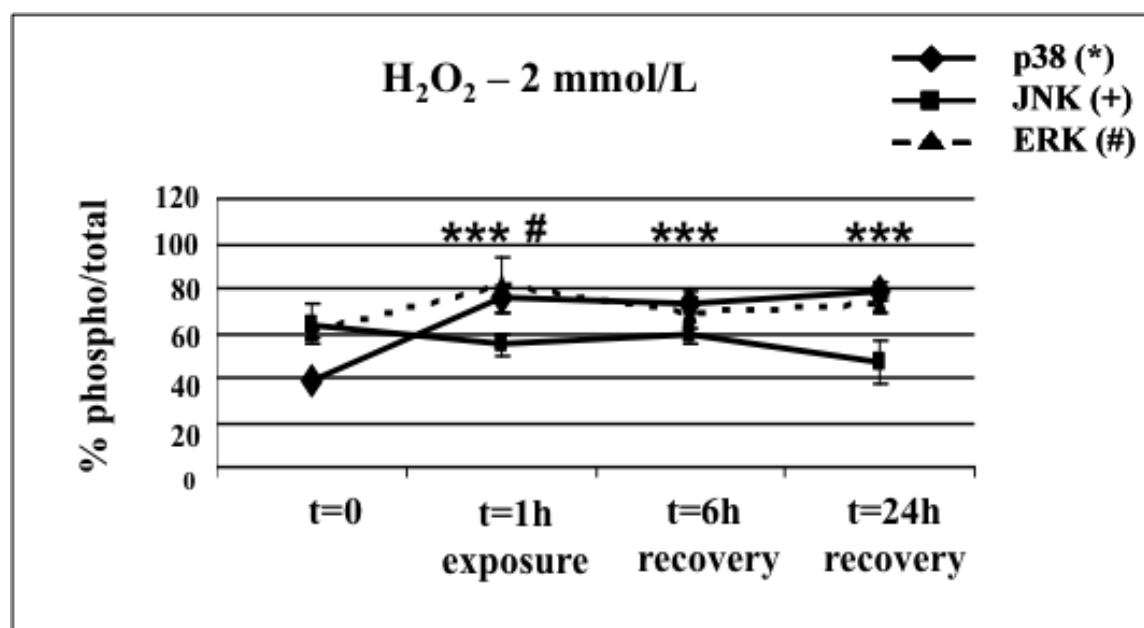


Fig. 2.

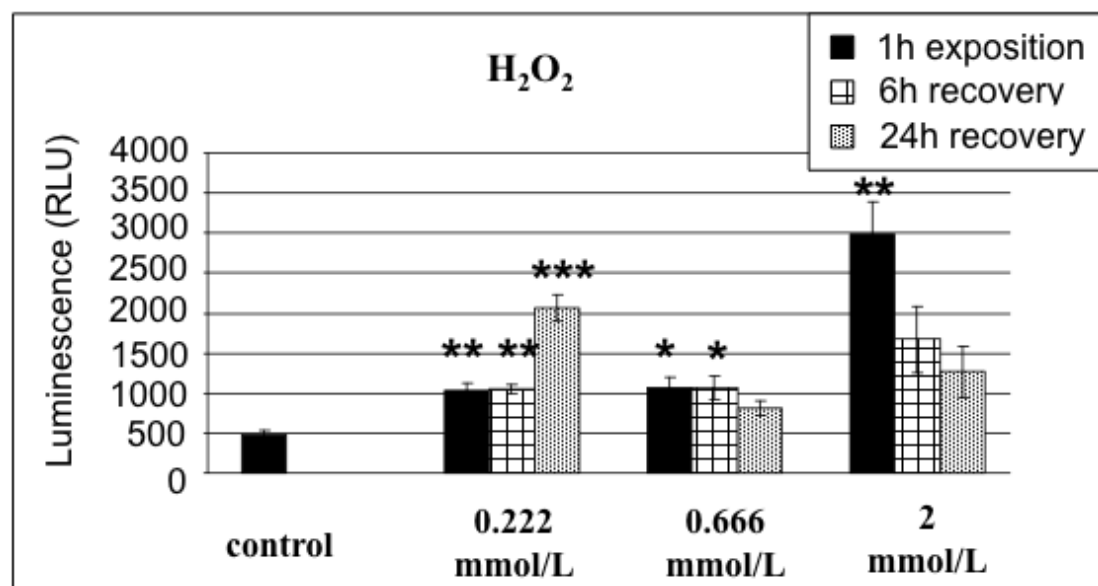


Fig. 3.

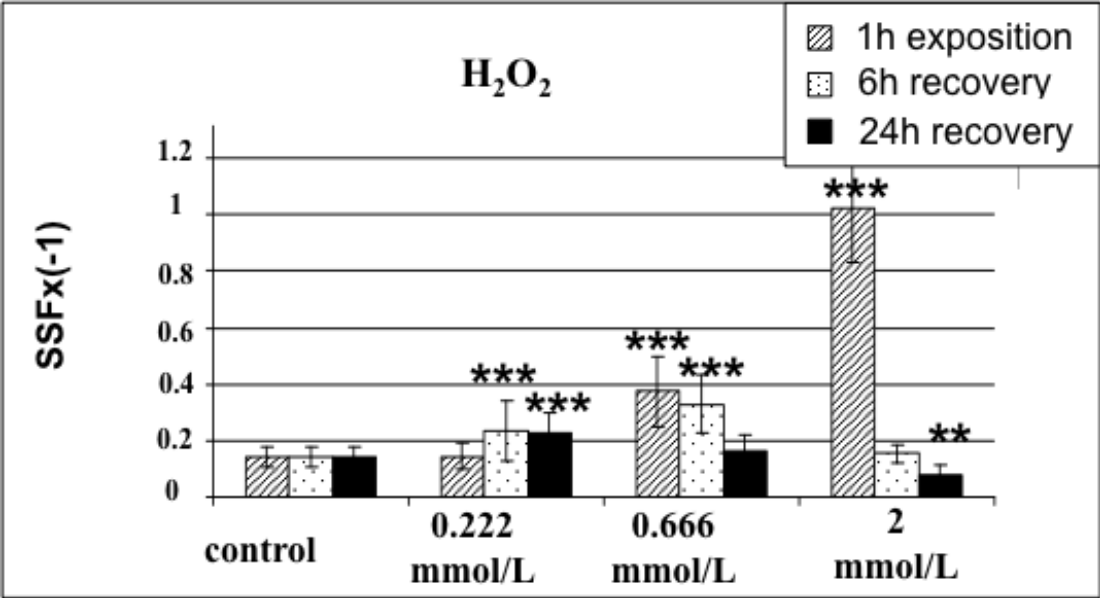
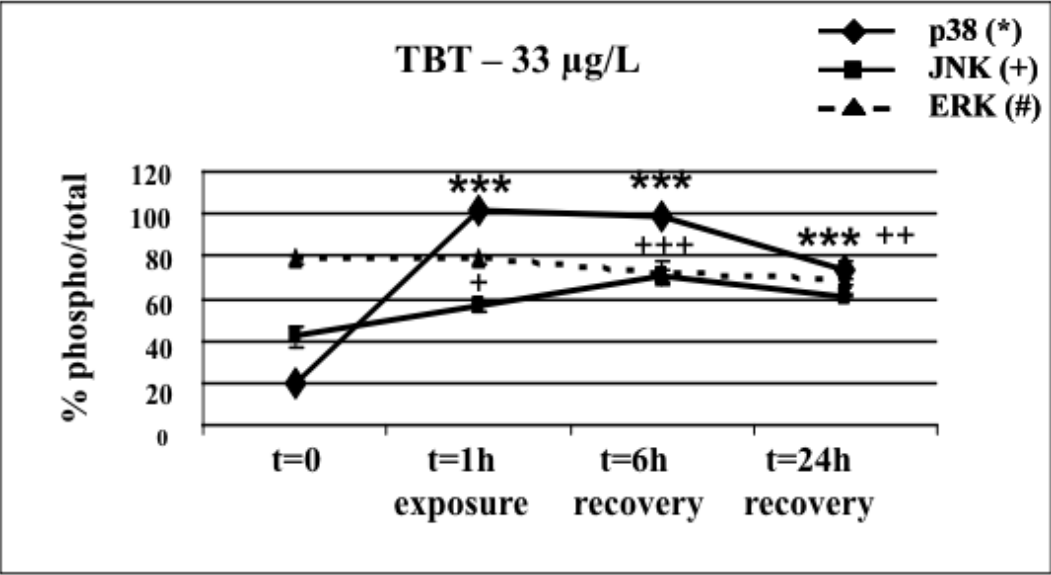


Fig. 4.





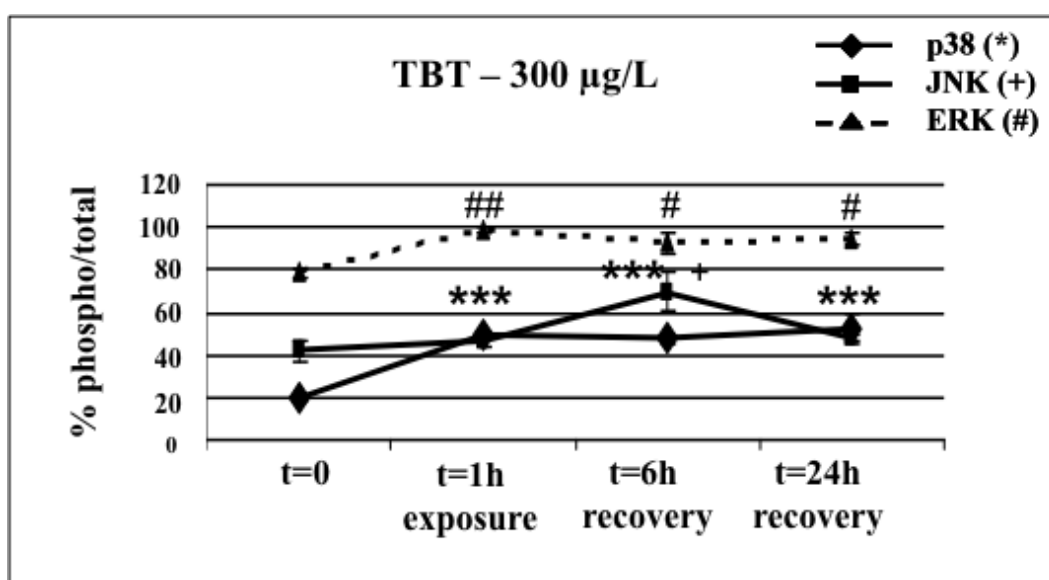
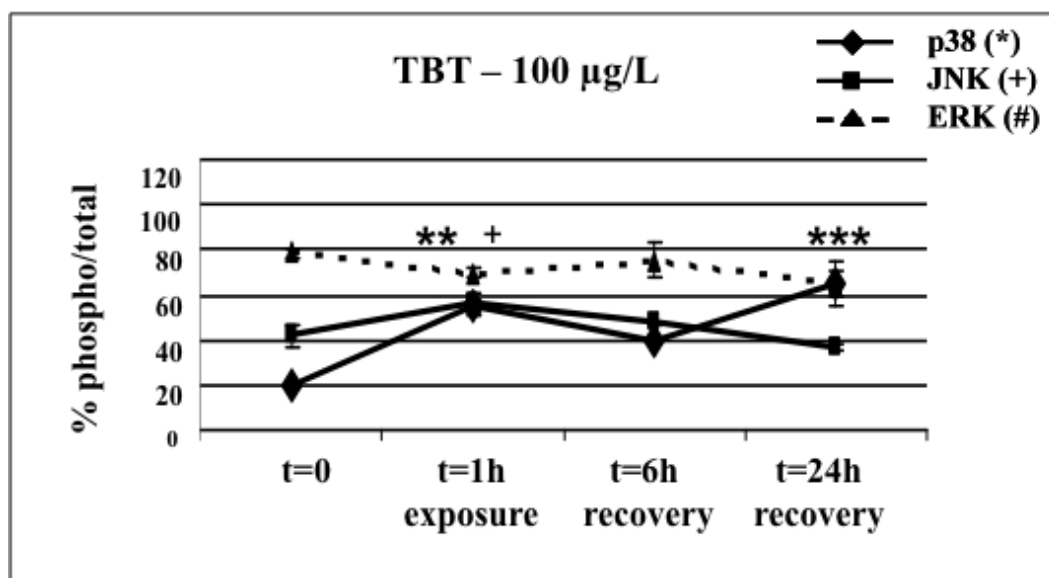


Fig. 5.

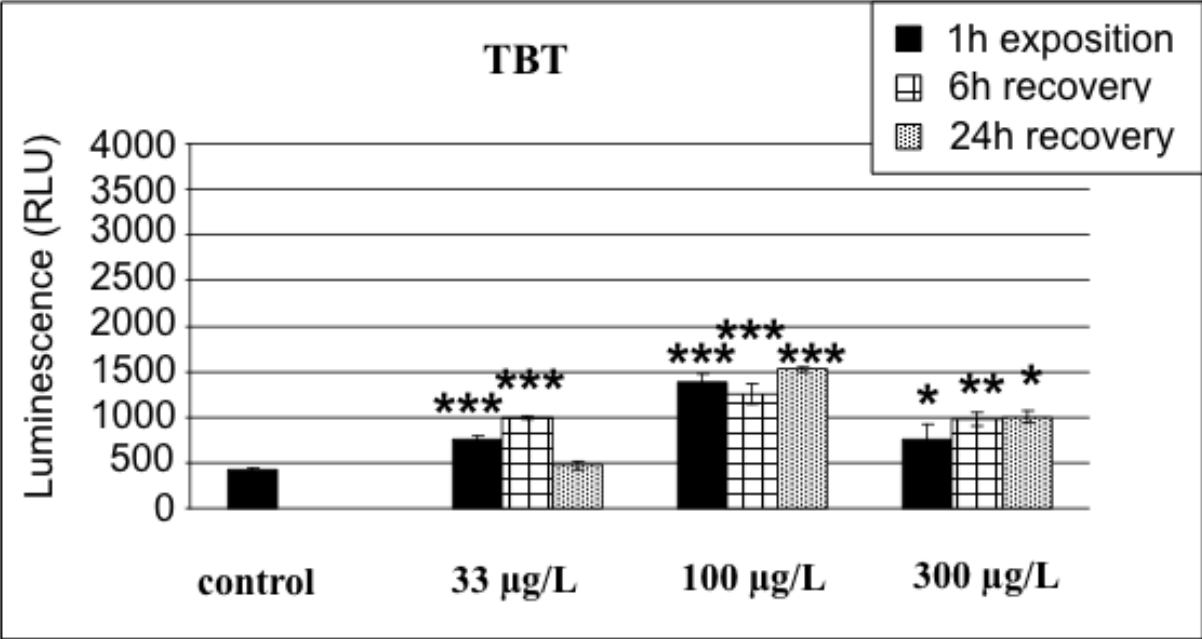


Fig. 6.

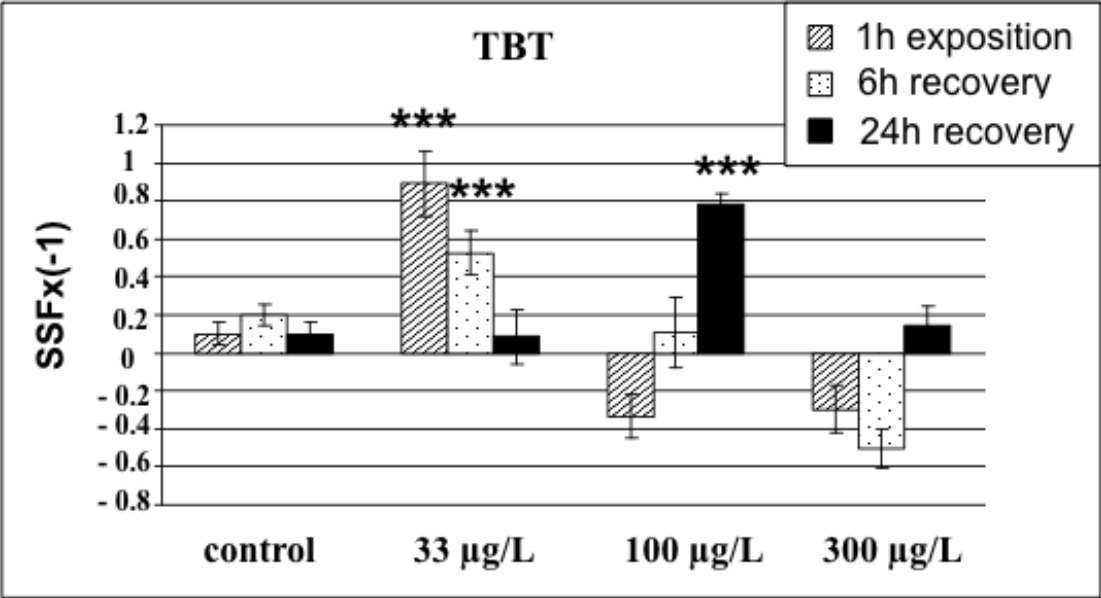
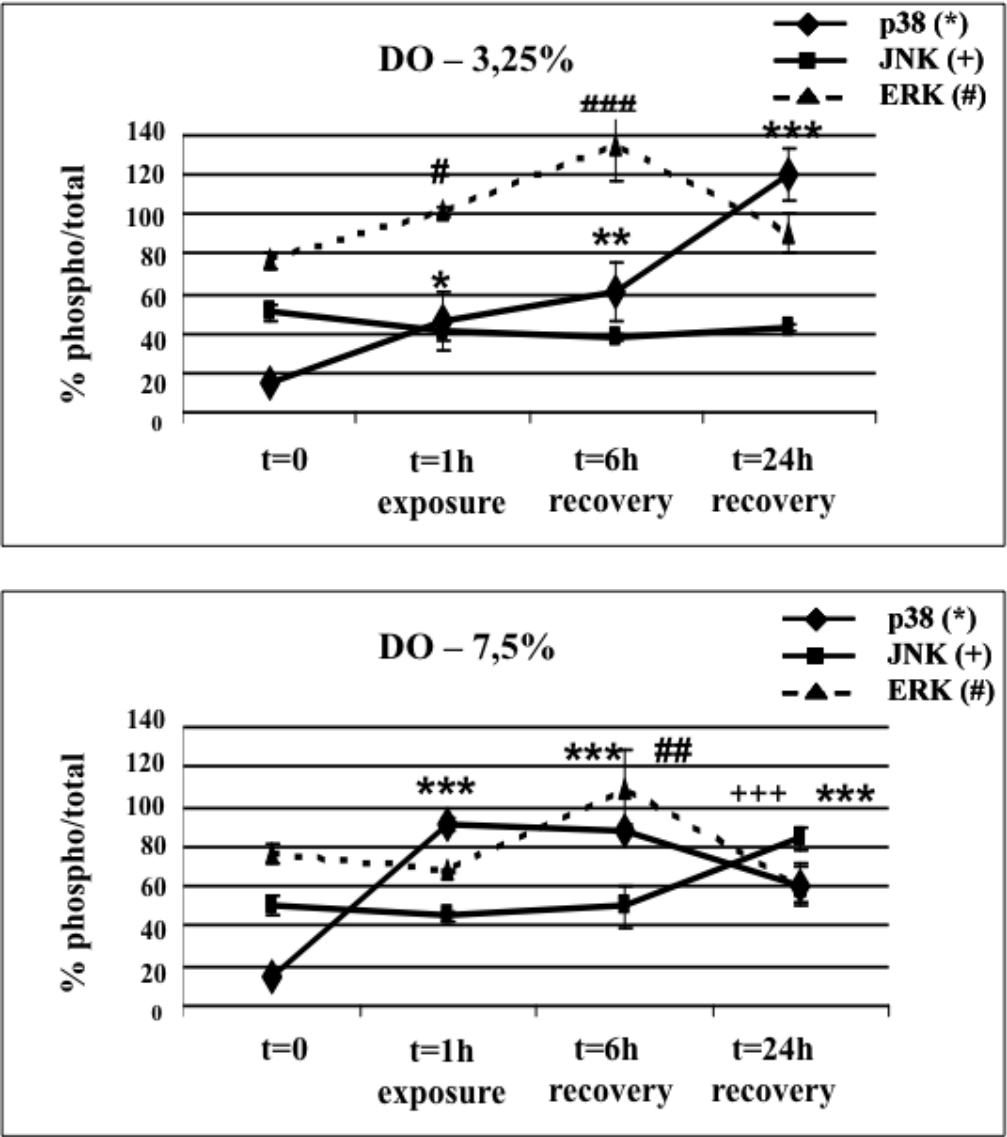


Fig. 7.



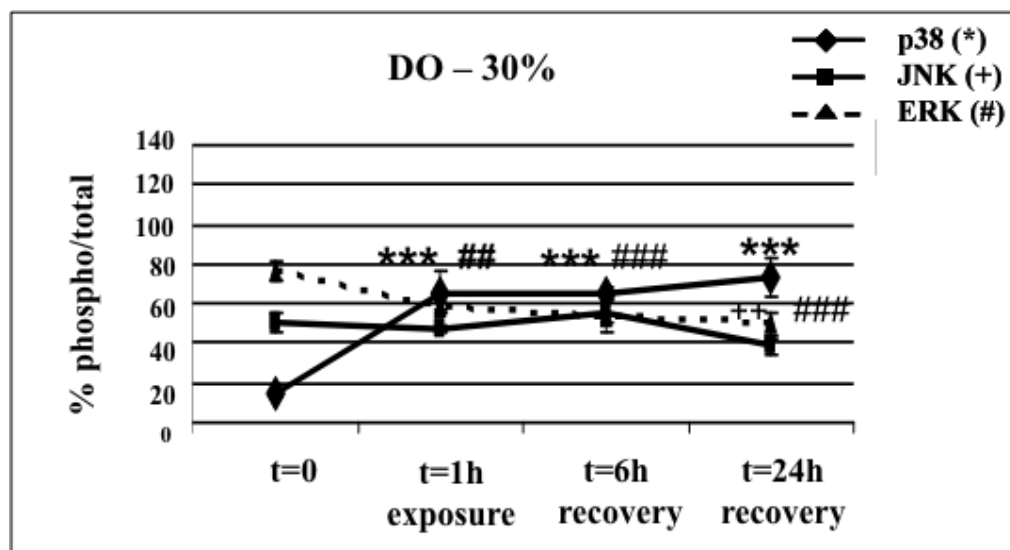
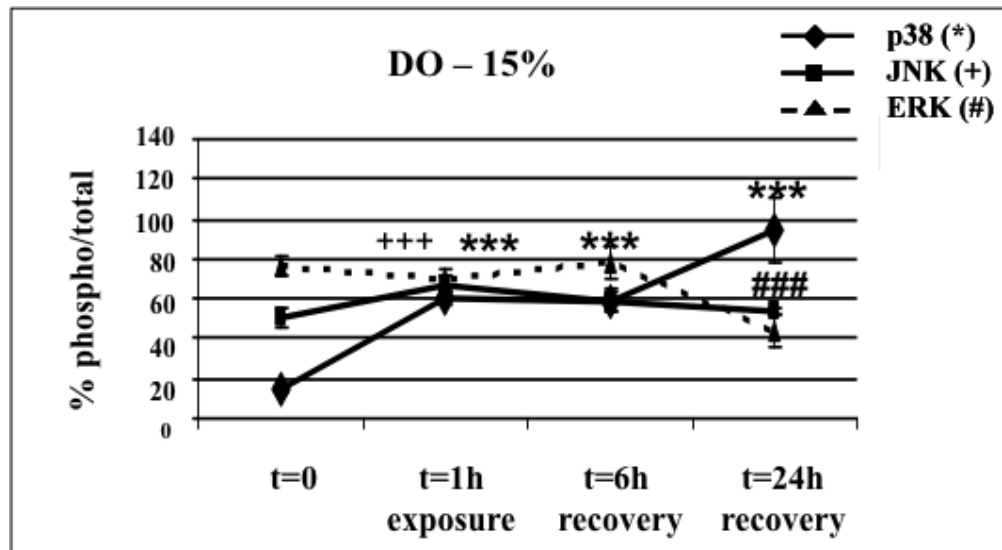


Fig. 8.

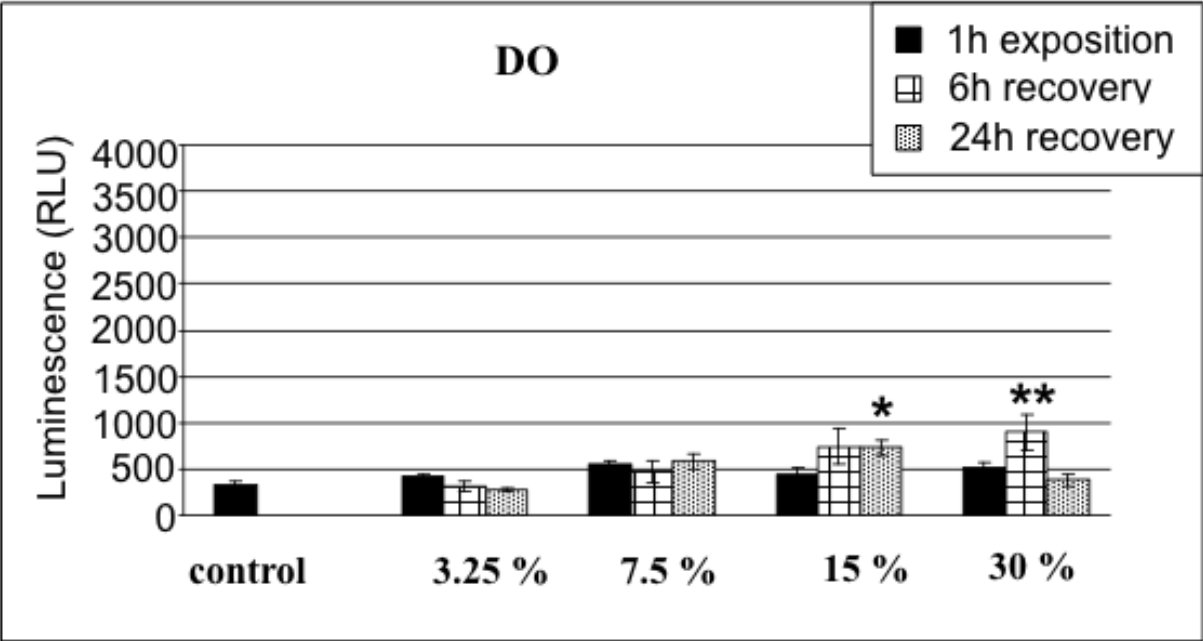
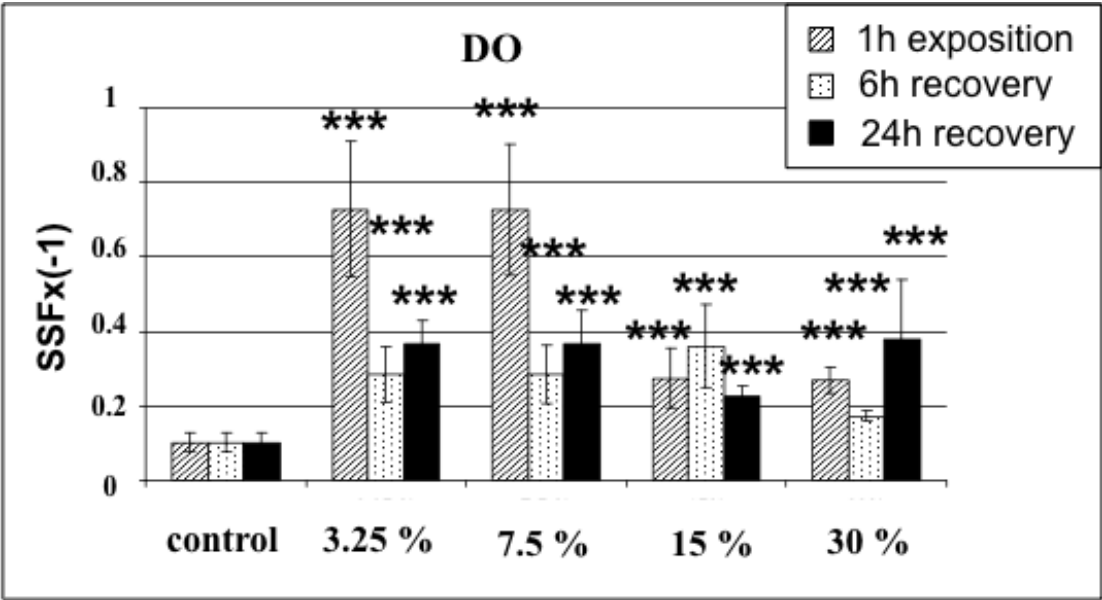
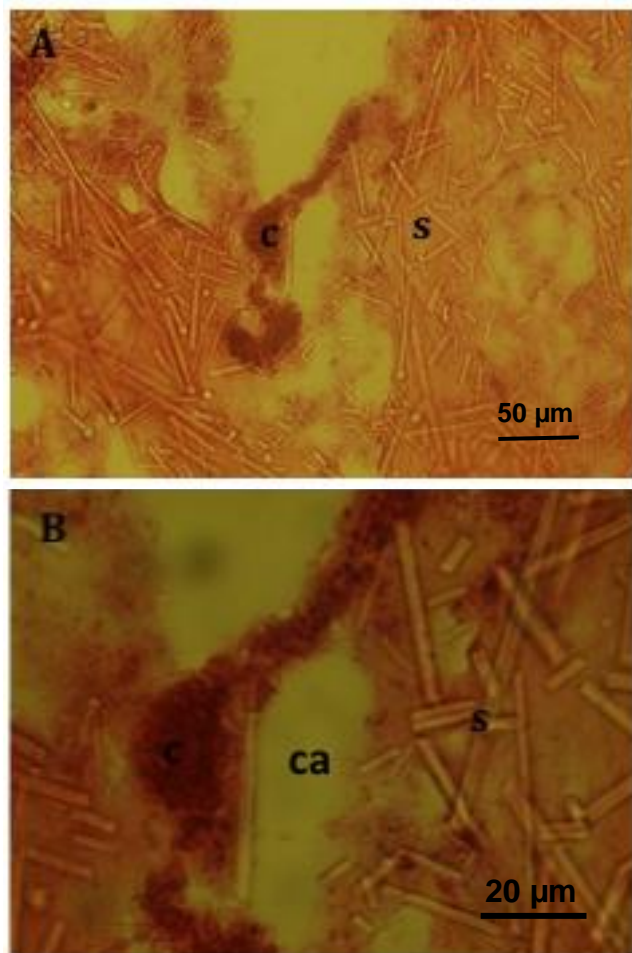


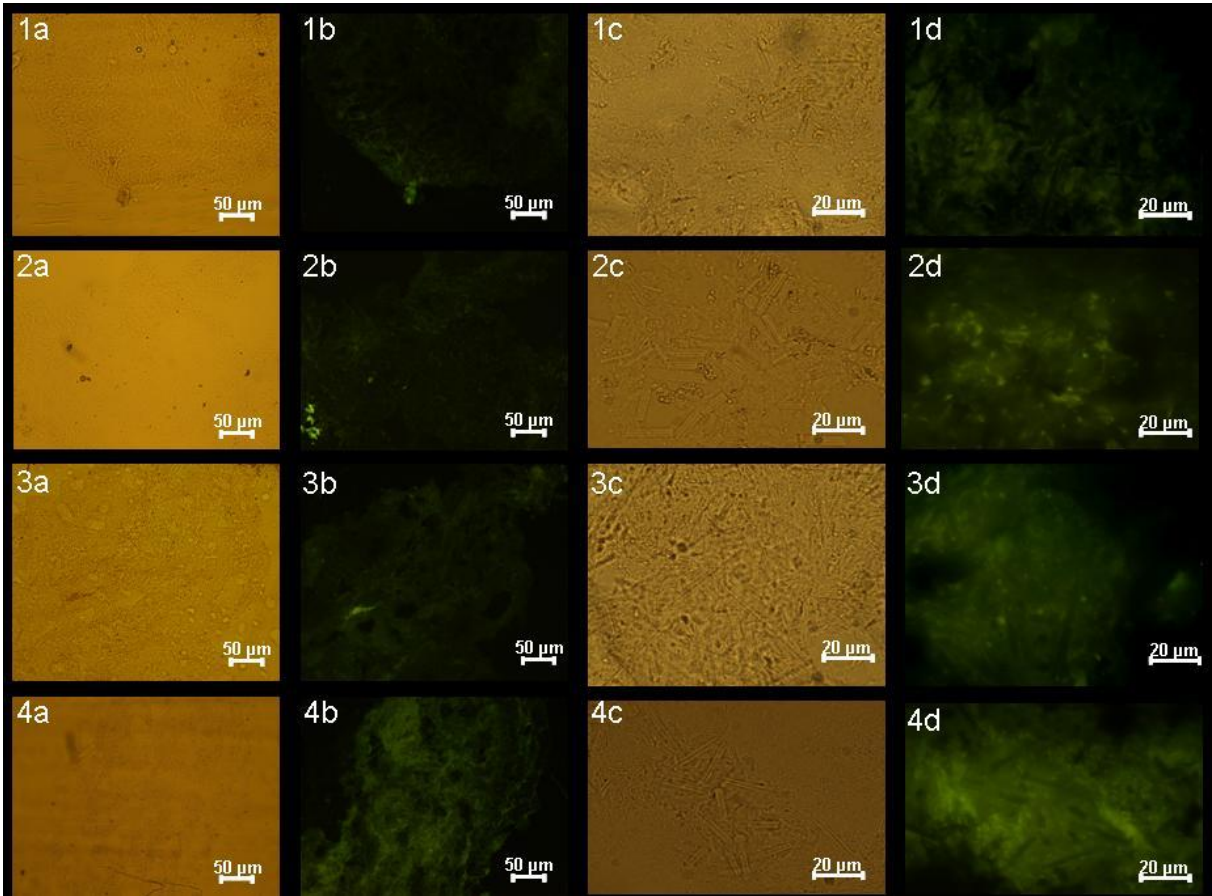
Fig. 9.



**Fig. 10.**



**Fig. 11.**



**Fig. 12.**

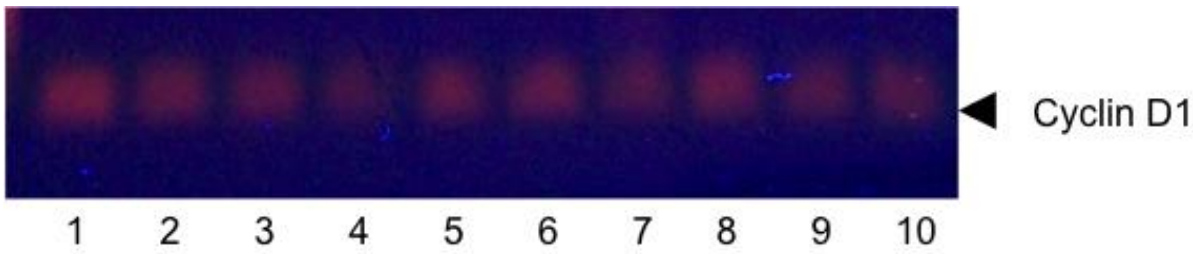
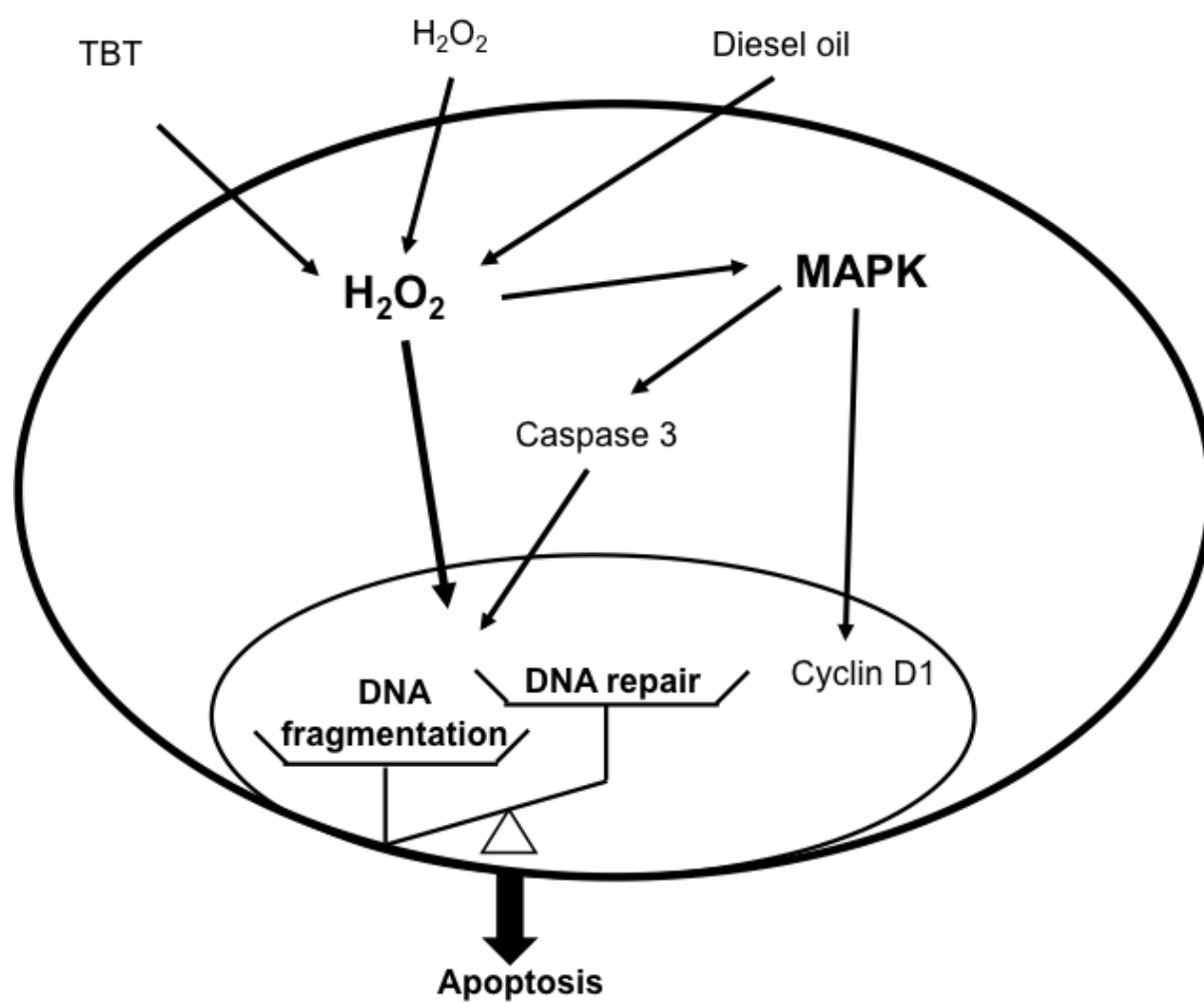


Fig. 13.





## BIBLIOGRAPHIE

- Abele, D., Heise, K., Portner, H.O., Puntarulo, S. (2002).** Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205(Pt 13): 1831-41.
- Ade, T., Zaucke, F., Krug, H.F. (1996).** The structure of organometals determines cytotoxicity and alteration of calcium homeostasis in HL-60 cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 354(5-6): 609-14.
- Afolabi A.O., Imevbore A.M.A., Adeyemi S.A. (1985).** Studies on the toxicity of some Nigerian crude oils to some aquatic organisms. Proceedings of the seminar on the petroleum industry and the Nigerian environment. Port-Harcourt, Nigeria pp. 269-273.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J. (2000).** Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo. *Aquat. Toxicol.* 49(4): 269-287.
- Akcha, F., Burgeot, T., Venier, P., Narbonne, J.F. (1999).** Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62(4): 455-62.
- Alfonso-De Matte, M.Y., Yang, H., Evans, M.S., Cheng, J.Q., Kruk, P.A. (2002).** Telomerase is regulated by c-Jun NH2-terminal kinase in ovarian surface epithelial cells. *Cancer. Res.* 62(16): 4575-8.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87(2): 171.
- Aluoch, A.O., Odman-Ghazi, S.O., Whalen, M.M. (2006).** Alteration of an essential NK cell signaling pathway by low doses of tributyltin in human natural killer cells. *Toxicology* 224(3): 229-37.
- Alzieu, C., Héral, M., Thibaud, Y., Dardignac, M.J., Feuille, M. (1981-1982).** Influence des peintures antisallissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huitre *Crassostrea gigas*. *Rev. Trav. Int. Pêches Marit.* 45, 101-116.
- Anestis, A., Lazou, A., Portner, H.O., Michaelidis, B. (2007).** Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293(2): R911-21.
- Ashkenazi, A. (2002).** Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer.* 2(6): 420-30.
- Augier, H., Benkoel, L., Brisse, J., Chamlian, A., Park, W.K. (1994).** Microscopic localization of mercury-selenium interaction products in liver, kidney, lung and brain of

Mediterranean striped dolphins (*Stenella Coeruleoalba*) by silver enhancement kit. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 39(7): 765-72.

**Bacus, S.S., Gudkov, A.V., Lowe, M., Lyass, L., Yung, Y., Komarov, A.P., Keyomarsi, K., Yarden, Y., Seger, R. (2001).** Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene*. 20(2): 147-55.

**Badger, A.M., Cook, M.N., Lark, M.W., Newman-Tarr, T.M., Swift, B.A., Nelson, A.H., Barone, F.C., Kumar, S. (1998).** SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J. Immunol.* 161(1): 467-73.

**Banni, M., Negri, A., Rebelo, M., Rapallo, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F. (2009).** Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus spp.*) exposed to organic contaminants. *Comp. Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 149(3): 414-8.

**Barnouin, K., Dubuisson, M.L., Child, E.S., Fernandez de Mattos, S., Glassford, J., Medema, R.H., Mann, D.J., Lam, E.W. (2002).** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J. Biol. Chem.* 277(16): 13761-70.

**Batel, R., Fafandjel, M., Blumbach, B., Schroder, H.C., Hassanein, H.M., Muller, I.M., Muller, W.E. (1998).** Expression of the human XPB/ERCC-3 excision repair gene-homolog in the sponge *Geodia cydonium* after exposure to ultraviolet radiation. *Mutat. Res.* 409(3): 123-33.

**Batel, R., Bihari, N., Rinkevich, B., Dapper, J., Shäcke, H., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. (1993).** Modulation of organotin-induced apoptosis by water pollutant methyl mercury in a human lymphoblastoid tumor cell line and a marine sponge. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 93, 245–251.

**Bech, M. (2002a).** Imposex and tributyltin contamination as a consequence of the establishment of a marina, and increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. *Environ. Pollut.* 117(3): 421-9.

**Bech, M., Strand, J., Jacobsen, J.A. (2002b).** Development of imposex and accumulation of butyltin in the tropical muricid *Thais distinguenda* transplanted to a TBT contaminated site. *Environ. Pollut.* 119(2): 253-60.

**Bech, M. (2002c).** A survey of imposex in muricids from 1996 to 2000 and identification of optimal indicators of tributyltin contamination along the east coast of Phuket Island, Thailand. *Mar. Pollut. Bull.* 44(9): 887-96.

**Beninger P.G., Dufour S.C. (1996)** Mucocyte distribution and relationship to particle transport on the pseudolamellibranch gill of *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137: 133±138

- Bergquist, P.R. (1978).** Sponges. *London, Hutchinson & Co.*
- Bernat, P., Dlugonski, J. (2006).** Acceleration of tributyltin chloride (TBT) degradation in liquid cultures of the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Chemospher.* 62(1): 3-8.
- Bhosle, N.B., Garg, A., Jadhav, S., Harjee, R., Sawant, S.S., Venkat, K., Anil, A.C. (2004).** Butyltins in water, biofilm, animals and sediments of the west coast of India. *Chemosphere.* 57(8): 897-907.
- Bihari, Batel, R., Zahn, R.K. (1990).** DNA determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo(a)pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. *Aquat. Toxicol.* 18, pp. 13–22.
- Bihari, N., Fafandel, M., Jaksic, Z., Plese, B., Batel, R. (2005).** Spatial distribution of DNA integrity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Adriatic Sea, Croatia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75(5): 845-50.
- Bihari, N., Fafandel, M., Piskur, V. (2007).** Polycyclic aromatic hydrocarbons and ecotoxicological characterization of seawater, sediment, and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Rijeka, the Adriatic Sea, Croatia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52(3): 379-87.
- Blagosklonny, M.V., Giannakakou, P., el-Deiry, W.S., Kingston, D.G., Higgs, P.I., Neckers, L., Fojo, T. (1997).** Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer. Res.* 57(1): 130-5.
- Blazquez, C., Galve-Roperh, I., Guzman, M. (2000).** De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *Faseb. J.* 14(14): 2315-22.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F. (2008).** Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat. Toxicol.* 89(4): 257-66.
- Bohm, M., Gamulin, V., Schroder, H.C., Muller, W.E. (2002).** Evolution of osmosensing signal transduction in Metazoa: stress-activated protein kinases p38 and JNK. *Cell. Tissue. Res.* 308(3): 431-8.
- Böhm, M., Hentschel, U., Friedrich, A., Fieseler, L., Steffen, R., Gamulin, V., Müller, I.M., Müller, W.E.G. (2001).** Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Mar. Biol.* 139:1037–1045.
- Bohm, M., Schroder, H.C., Muller, I.M., Muller, W.E., Gamulin, V. (2000).** The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is conserved in metazoans: cloning and activation of p38 of the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biol. Cell.* 92(2): 95-104.

- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C.B. (1993).** bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 74(4): 597-608.
- Bolognesi C., Rabboni R., Roggieri, P. (1996).** Genotoxicity biomarkers in *M. Galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C, N°2: 319-323.
- Bonnard, M., Eom, I.C., Morel, J.L., Vasseur, P. (2009).** Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Mol. Mutagen.* 50(1): 60-7.
- Borner C. (2003).** The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 39(11):615-47.
- Bost, F., McKay, R., Dean, N., Mercola, D. (1997).** The JUN kinase/stress-activated protein kinase pathway is required for epidermal growth factor stimulation of growth of human A549 lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 272(52): 33422-9.
- Böttger, S., Jerszyk, E., Low, B., Walker, C. (2008).** Genotoxic stress-induced expression of p53 and apoptosis in leukemic clam hemocytes with cytoplasmically sequestered p53. *Cancer. Res.* 68(3): 777-82.
- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D. (1991).** ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 65(4): 663-75.
- Branch, G. M., Steffani, C. N. (2004).** Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300: 189-215.
- Bravarenko, N.I., Onufriev, M.V., Stepanichev, M.Y., Ierusalimsky, V.N., Balaban, P.M., Gulyaeva, N.V. (2006).** Caspase-like activity is essential for long-term synaptic plasticity in the terrestrial snail *Helix*. *Eur. J. Neurosci.* 23(1): 129-40.
- Brümmer, F., elacinaï, B., Götz, M., Leitermann, F., Nickel, M., Schillak, L., Sidri, M., Zucht, W. (2004).** Overview on the sponge fauna of the Limski kanal, Croatia, Northern Adriatic Sea. *Boll. Mus. Ist. Biol. (Genova)* 68: 219-227.
- Brusca, R., Brusca, G. (2003).** Invertebrates. *Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.*
- Buckland-Nicks, J., Tompkins, G. (2005).** Paraspermatogenesis in *Ceratostoma foliatum* (Neogastropoda): confirmation of programmed nuclear death. *J. Exp. Zool A. Comp. Exp. Biol.* 303(9): 723-41.

- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C., Garrigues, P., (1998).** Evaluation of the sediment contamination by PAHs in the *Gironde estuary*. *Mar. Chem.* 58 : 85- 97.
- Buggy, C.J.,Tobin, J.M. (2006).** Seasonal and spatial distributions of tributyltin in surface sediment of the Tolka Estuary, Dublin, Ireland. *Environ. Pollut.* 143(2): 294-303.
- Bulavin, D.V., Saito, S., Hollander, M.C., Sakaguchi, K., Anderson, C.W., Appella, E.,Fornace, A.J., Jr. (1999).** Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo. J.* 18(23): 6845-54.
- Burlando, B., Berti, E.,Viarengo, A. (2006).** Effects of seawater pollutants on protein tyrosine phosphorylation in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 78 Suppl 1: S79-85.
- Burnett, L.E., (1997).** The challenges of living in hypoxic and hypercapnic aquatic environments. *Am. Zool.* 37, 633-640.
- Burton, E.D., Phillips, I.R.,Hawker, D.W. (2004).** Sorption and desorption behavior of tributyltin with natural sediments. *Environ. Sci. Technol.* 38(24): 6694-700.
- Burton, E.D., Phillips, I.R.,Hawker, D.W. (2006).** Tributyltin partitioning in sediments: effect of aging. *Chemosphere.* 63(1): 73-81.
- Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V.N., Fuchs, S.Y., Henderson, S., Fried, V.A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M.R., Gaarde, W.A., Holbrook, N.J., Shiloh, Y.,Ronai, Z. (2001).** Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol. Cell. Biol.* 21(8): 2743-54.
- Butler, P.A. (1971).** Influence of pesticides on marine ecosystems. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 177(48): 321-9.
- Cahill, M.A., Janknecht, R.,Nordheim, A. (1996).** Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr. Biol.* 6(1): 16-9.
- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J.,Der, C.J. (1998).** Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene.* 17(11 Reviews): 1395-413.
- Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P.,Kroemer, G. (2002).** Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell. Sci.* 115(Pt 24): 4727-34.
- Canesi, L., Betti, M., Lorusso, L.C., Ciacci, C.,Gallo, G. (2005).** 'In vivo' effects of Bisphenol A in *Mytilus hemocytes*: modulation of kinase-mediated signalling pathways. *Aquat. Toxicol.* 71(1): 73-84.

- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Lorusso, L.C., Marchi, B., Burattini, S., Falcieri, E., Gallo, G. (2004a).** Rapid effects of 17 beta-estradiol on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 136(1): 58-71.
- Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Zampini, M., Gallo, G. (2004b).** Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways. *Gen. Comp. Endocrinol.* 138(1): 58-69.
- Canesi, S., Bouchu, D., Ciufolini, M.A. (2004c).** Fully stereocontrolled total syntheses of (-)-cylindricine C and (-)-2-epicylindricine C: a departure in sulfonamide chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43(33): 4336-8.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G. (2003).** Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquat. Toxicol.* 63(3): 293-306.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C. (2002a).** Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 57(6): 469-76.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G. (2002b).** Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev. Comp. Immunol.* 26(4): 325-34.
- Canesi, L., Scarpato, A., Betti, M., Ciacci, C., Pruzzo, C., Gallo, G. (2002c).** Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Mar. Environ. Res.* 54(3-5): 547-51.
- Canesi, L., Pruzzo, C., Tarsi, R., Gallo, G. (2001).** Surface interactions between *Escherichia coli* and hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* lam. leading to efficient bacterial clearance. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 464-8.
- Carballo, J. L., Naranjo, S., Garcia-Gomez, J. (1996).** Use of marine sponges as stress indicators in marine ecosystems at Algeciras Bay (southern Iberian Peninsula). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 135: 109-122.
- Cardone, M.H., Salvesen, G.S., Widmann, C., Johnson, G., Frisch, S.M. (1997).** The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell.* 90(2): 315-23.
- Carlton, J. T. (1992).** Introduced marine and estuarine mollusks of North America: an end-of-the-20th-century perspective. *J. Shell. Res.* 11 (2): 489-505.
- Carter, L.A., Tabor, M.B., Bonner, J.C., Bonner, L.A. (2002).** Mitogen-activated protein kinase activation by oxidative and bacterial stress in an amphibian cell culture model. *Environ. Health. Perspect.* 110(7): 641-5.

- Casano, C., Roccheri, M.C., Maenza, L., Migliore, S., Gianguzza, F. (2003).** Sea urchin deciliation induces thermoresistance and activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Cell. Stress. Chaperones*. 8(1): 70-5.
- Cati, L. (1981).** Idrografia e idrologia del Po. Ministero dei Lavori Pubblici, Servizio Idrografico, Ufficio Idrografico del Po. Pubbl., 19: 310 pp.
- Cebrian, E., Uriz, M.J. (2007a).** Contrasting effects of heavy metals and hydrocarbons on larval settlement and juvenile survival in sponges. *Aquat. Toxicol.* 81(2): 137-43.
- Cebrian, E., Uriz, M.J., Turon, X. (2007b).** Sponges as biomonitors of heavy metals in spatial and temporal surveys in northwestern mediterranean: multispecies comparison. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(11): 2430-9.
- Ceccherelli, V. U., Rossi, R. (1984).** Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 16: 173-184.
- Chen, S., Nguyen, N., Tamura, K., Karin, M., Tukey, R.H. (2003).** The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278(21): 19526-33.
- Chen, S., Gardner, D.G. (2002).** Osmoregulation of natriuretic peptide receptor signaling in inner medullary collecting duct. A requirement for p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* 277(8): 6037-43.
- Chen, Y.C., Tsai, S.H., Shen, S.C., Lin, J.K., Lee, W.R. (2001).** Alternative activation of extracellular signal-regulated protein kinases in curcumin and arsenite-induced HSP70 gene expression in human colorectal carcinoma cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 80(3): 213-21.
- Chen, Y.R., Tan, T.H. (1998).** Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene*. 17(2): 173-8.
- Cheng, X.P., Wang, B.R., Liu, H.L., You, S.W., Huang, W.J., Jiao, X.Y., Ju, G. (2003).** Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is predominantly enhanced in the microglia of the rat spinal cord following dorsal root transection. *Neuroscience*. 119(3): 701-12.
- Chiavarini, S., Massanisso, P., Nicolai, P., Nobili, C., Morabito, R. (2003).** Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*. 50(3): 311-9.
- Choi, J.H., Ahn, K.S., Kim, J., Hong, Y.S. (2000).** Enhanced induction of Bax gene expression in H460 and H1299 cells with the combined treatment of cisplatin and adenovirus mediated wt-p53 gene transfer. *Exp. Mol. Med.* 32(1): 23-8.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1):156-9.



- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., Burighel, P. (1998).** Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40(1-2): 160-5.
- Cima, F., Marin, M.G., Matozzo, V., Da Ros, L., Ballarin, L. (1998).** Immunotoxic effects of organotin compounds in *Tapes philippinarum*. *Chemosphere*. 37(14-15): 3035-45.
- Colosio, C., Birindelli, S., Corsini, E., Galli, C.L., Maroni, M. (2005).** Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207(2 Suppl): 320-8.
- Cossa, D. (1989).** A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanol. Acta*. 12: 417-423.
- Couzinet, A., Hérincs, Z., Hueber, A.O. (2002).** Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Medecine/Sciences*. 18: 841-52.
- Craxton, A., Shu, G., Graves, J.D., Saklatvala, J., Krebs, E.G., Clark, E.A. (1998).** p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J. Immunol.* 161(7): 3225-36.
- Creasy, C.L., Chernoff, J. (1995).** Cloning and characterization of a human protein kinase with homology to Ste20. *J. Biol. Chem.* 270(37): 21695-700.
- Da Silva, J., Pierrat, B., Mary, J.L., Lesslauer, W. (1997).** Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem* 272(45): 28373-80.
- Dahl, S.C., Handler, J.S., Kwon, H.M. (2001).** Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280(2): C248-53.
- Damiani, F., Gianguzza, M., Dolcemascolo, G. (2009).** Effects of tributyltin chloride in ascidian embryos: modulation of kinase-mediated signalling pathways. *I. S. J.* 6, 87-94.
- Das, M., Mukherjee, S.B., Shaha, C. (2001).** Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Cell. Sci.* 114(Pt 13): 2461-9.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., Laroche, S. (2000).** The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus *in vivo*. *J. Neurosci.* 20(12): 4563-72.
- Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., Yancopoulos, G.D. (1994).** Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science*. 266(5186): 816-9.
- Dayton, P. K., Robilliard, G. A. , Paine, R. T. (1970).** Benthic faunal zonation as a result of anchor ice at McMurdo Sound, Antarctica. *Antarctic ecology*, Holdgate, M. W. (ed.) Vol. 1. Academic Press, London, p. 244-258.

- DeLong, G.T., Rice, C.D. (1997).** Tributyltin potentiates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced cytochrome P-4501A-related activity. *J. Toxicol. Environ. Health.* 51(2): 131-48.
- Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P., May, W.S., Jr. (2001).** Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J. Biol. Chem.* 276(26): 23681-8.
- Dhillon, A.S., von Kriegsheim, A., Grindlay, J., Kolch, W. (2007).** Phosphatase and feedback regulation of Raf-1 signaling. *Cell. Cycle.* 6(1): 3-7.
- Diez, S., Jover, E., Albaiges, J., Bayona, J.M. (2006).** Occurrence and degradation of butyltins and wastewater marker compounds in sediments from Barcelona harbor, Spain. *Environ. Int.* 32(7): 858-65.
- Diez, S., Lacorte, S., Viana, P., Barcelo, D., Bayona, J.M. (2005).** Survey of organotin compounds in rivers and coastal environments in Portugal 1999-2000. *Environ. Pollut.* 136(3): 525-36.
- Devauchelle, N. (2002).** Bilan de santé des organismes et des écosystèmes marins. *Bilan et perspectives* – IFREMER : 43 p.
- Dobretsov, S., Dahms, H.U., Qian, P.Y. (2006).** Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling.* 22(1-2): 43-54.
- Donovan, S., See, W., Bonifas, J., Stokoe, D., Shannon, K.M. (2002).** Hyperactivation of protein kinase B and ERK have discrete effects on survival, proliferation, and cytokine expression in Nf1-deficient myeloid cells. *Cancer. Cell.* 2(6): 507-14.
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., Oehlmann, J. (2003).** Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(1): 145-52.
- Dujmušić, A. (2000).** Croatian fisheries under the surface. *Rabus media*, Zagreb, 218 pp.
- Dural, M., Lugal Goksu, M.Z., Ozak, A.A., Derici, B. (2006).** Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L, 1758, *Sparus aurata* L, 1758 and *Mugil cephalus* L, 1758 from the Camlik lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). *Environ. Monit. Assess.* 118(1-3): 65-74.
- Durham, T.R., Snow, E.T. (2006).** Metal ions and carcinogenesis. *Exs.* (96): 97-130.
- Dwivedi, J., Trombetta, L.D. (2006).** Acute toxicity and bioaccumulation of tributyltin in tissues of *Urolophus jamaicensis* (yellow stingray). *J. Toxicol. Environ. Health A.* 69(14): 1311-23.
- Efremova, S.M., Margulis, B.A., Guzhova, I.V., Itskovich, V.B., Lauenroth, S., Muller, W.E., Schroder, H.C. (2002).** Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in

Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant. *Aquat. Toxicol.* 57(4): 267-80.

**Enwere, R., Pollard, P., Webster, L., Davies, I., Moffat, C. (2009).** Oil spill management: elimination kinetics of PAHs in mussels (*Mytilus edulis*). *J. Environ. Monit.* 11(6): 1284-91.

**Fabbri, D., Baravelli, V., Giannotti, K., Donnini, F., Fabbri, E. (2006).** Bioaccumulation of cyclopenta[cd]pyrene and benzo[ghi]fluoranthene by mussels transplanted in a coastal lagoon. *Chemosphere.* 64(7): 1083-92.

**Fabbri, E., Valbonesi, P., Franzellitti, S. (2008).** HSP expression in bivalves. Interdepartment Centre for Environmental Science Research, University of Bologna, campus of Ravenna, Italy

**Fafandel, M., Müller, W.E.G., Batel, R. (2003).** Molecular response to TBT stress in marine sponge *Suberites domuncula*: proteolytical cleavage and phosphorylation of KRS\_SD protein kinase. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 297 : 239-252.

**Faulkner, D.J. (2000).** Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 17(1): 7-55.

**Fent, K. (1992).** Embryotoxic effects of tributyltin on the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Environ. Pollut.* 76:187-194.

**Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1996).** *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93(15): 7464-9.

**Fernandez, M.A., de Luca Rebello Wagener, A., Limaverde, A.M., Scofield, A.L., Pinheiro, F.M., Rodrigues, E. (2005).** Imposex and surface sediment speciation: a combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Environ. Res.* 59(5): 435-52.

**Fernandez, M.A., Limaverde, A.M., de Castro, I.B., Almeida, A.C., de Luca Rebello Wagener, A. (2002).** Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Cad. Saude. Publica.* 18(2): 463-76.

**Fiol, D.F., Kultz, D. (2007).** Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *Febs. J.* 274(22): 5790-8.

**Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Volety, A.K. (2003).** Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquat. Toxicol.* 64(4): 375-91.

- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R. (2000).** A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51(1): 115-38.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N., Ronai, Z. (1998).** JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes. Dev.* 12(17): 2658-63.
- Gabrieldes, G. (Ed.), 1997.** The MED POL Biomonitoring Program Concerning the effects of Pollutants on Marine Organisms Along the Mediterranean Coasts.
- Gacic, M., Lascaratos, A., Manca, B.B., Mantziafou, A. (2001).** Adriatic deep water and interaction with the eastern Mediterranean. *Physical Oceanography of the Adriatic Sea.* Cushman-Roisin, B., et al (Eds.), 111-142.
- Gadd, G.M. (2000).** Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *Sci. Total. Environ.* 258(1-2): 119-27.
- Gagne, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S., Viglino, L. (2003).** Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence river (Quebec, Canada). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 134(2): 189-98.
- Gaitanaki, C., Kefaloyianni, E., Marmari, A., Beis, I. (2004).** Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Mol. Cell. Biochem.* 260(1-2): 119-27.
- Gaitanaki, C., Konstantina, S., Chrysa, S., Beis, I. (2003).** Oxidative stress stimulates multiple MAPK signalling pathways and phosphorylation of the small HSP27 in the perfused amphibian heart. *J. Exp. Biol.* 206(Pt 16): 2759-69.
- Galloway, T.S., Depledge, M.H. (2001).** Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology.* 10(1): 5-23.
- Gambaro, A., Manodori, L., Toscano, G., Contini, D., Donato, A., Belosi, F., Prodi, F., Cescon, P. (2007).** PAHs and trace elements in PM(2.5) at the Venice Lagoon. *Ann. Chim.* 97(5-6): 343-58.
- Gamulin, V., Skorokhod, A., Kavsan, V., Muller, I.M., Muller, W.E. (1997).** Experimental indication in favor of the introns-late theory: the receptor tyrosine kinase gene from the sponge *Geodia cydonium*. *J. Mol. Evol.* 44(3): 242-52.
- Garaventa, F., Centanni, E., Pellizzato, F., Faimali, M., Terlizzi, A., Pavoni, B. (2007).** Imposex and accumulation of organotin compounds in populations of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) from the Lagoon of Venice (Italy) and Istrian Coast (Croatia). *Mar. Pollut. Bull.* 54(5): 615-22.

- Garaventa, F., Faimali, M., Terlizzi, A. (2006).** Imposex in pre-pollution times. Is TBT to blame? *Mar. Pollut. Bull.* 52(6): 701-2.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003).** ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31(13) : 3784-8.
- Giaccia, A.J., Kastan, M.B. (1998).** The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes. Dev.* 12(19): 2973-83.
- Gibson, C.P., Wilson, S.P. (2003).** Imposex still evident in eastern Australia 10 years after tributyltin restrictions. *Mar. Environ. Res.* 55(2): 101-12.
- Goldberg, E.D. (1975).** Synthetic organohalides in the sea. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 189(1096): 277-89.
- Gonzalez, F.A., Seth, A., Raden, D.L., Bowman, D.S., Fay, F.S., Davis, R.J. (1993).** Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J. Cell. Biol.* 122(5): 1089-101.
- Gorria, M., Tekpli, X., Sergent, O., Huc, L., Gaboriau, F., Rissel, M., Chevanne, M., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossmann, D. (2006).** Membrane fluidity changes are associated with benzo[a]pyrene-induced apoptosis in F258 cells: protection by exogenous cholesterol. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 1090: 108-12.
- Gosling, E. (2003).** Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. *Oxford: Fishing News Books.*
- Goulan, H., Yong, W. (1995).** Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels. *Wat. Res.* 29 (8): 1877-84.
- Graves, J.D., Krebs, E.G. (1999).** Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol. Ther.* 82(2-3): 111-21.
- Greaves, J., Unger, M.A. (1988).** A selective ion monitoring assay for tributyltin and its degradation products. *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* 15(10): 565-9.
- Guan, Z., Buckman, S.Y., Miller, B.W., Springer, L.D., Morrison, A.R. (1998).** Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 273(44): 28670-6.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E., Escoubas, J.M. (2003).** Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene.* 303: 139-45.

- Gupta, S. (2003).** Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int. J. Oncol.* 22(1): 15-20.
- Haeckel, E. (1896).** Systematische Phylogenie der Wirbellosen Thiere; Teil 2. Georg Reimer, Berlin.
- Hagger, J.A., Depledge, M.H., Oehlmann, J., Jobling, S., Galloway, T.S. (2006).** Is there a causal association between genotoxicity and the imposex effect? *Environ. Health. Perspect.* 114 Suppl 1: 20-6.
- Hallberg, B., Rayter, S.I., Downward, J. (1994).** Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J. Biol. Chem.* 269(6): 3913-6.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1991).** DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS. Lett.* 281(1-2): 9-19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1992).** Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 307(1): 108-12.
- Hamer, B., Vucelic, V., Jaksic, Z., Pavicic-Hamer, D., Chatel, A., Wiens, M., Batel, R., (2009).** Protein carbonyl groups in gills of the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of oxidative stress. 14th ISTA Symposium, METZ.
- Hamer, B., Jaksic, Z., Pavicic-Hamer, D., Peric, L., Medakovic, D., Ivankovic, D., Pavicic, J., Zilberberg, C., Schroder, H.C., Muller, W.E., Smodlaka, N., Batel, R. (2008).** Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquat. Toxicol.* 89(3): 137-51.
- Hartwell, L. (1992).** Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell.* 71(4): 543-6.
- Hassani, L.H., Frenich, A.G., Benajiba, M.H., Rodriguez, M.J., Vidal, J.L., Debdoubi, A. (2006).** Assessment of butyltin and phenyltin pollution in the sea mullet, *Mugil cephalus*, along the Moroccan and Spanish coasts (Mediterranean Sea). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51(4): 608-14.
- Haygood, M.G., Schmidt, E.W., Davidson, S.K., Faulkner, D.J. (1999).** Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 33-43.
- Heidrich, D.D., Steckelbroeck, S., Klingmuller, D. (2001).** Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids.* 66(10): 763-9.
- Helmuth, B.S., Hofmann, G.E. (2001).** Microhabitats, thermal heterogeneity, and patterns of physiological stress in the rocky intertidal zone. *Biol. Bull.* 201(3): 374-84.

- Henkart, P.A. (1996).** ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* 4(3): 195-201.
- Henkart, P.A., Grinstein, S. (1996).** Apoptosis: mitochondria resurrected? *J. Exp. Med.* 183(4): 1293-5.
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J., Horn, M. (2003).** Microbial diversity of marine sponges. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 37: 59-88.
- Hill, R.T. (2004).** Microbes from marine sponges: a treasure trove of biodiversity for natural products discovery. *Bull. A.T.* (ed.), Microbial diversity and bioprospecting, ASM Press, Washington, D.C., pp. 177–190.
- Holme, J.A., Gorria, M., Arlt, V.M., Ovrebo, S., Solhaug, A., Tekpli, X., Landvik, N.E., Huc, L., Fardel, O., Lagadic-Gossmann, D. (2007).** Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chem. Biol. Interact.* 167(1): 41-55.
- Hong, H.K., Takahashi, S., Min, B.Y., Tanabe, S. (2002).** Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. *Environ. Pollut.* 117(3): 475-86.
- Hooper, J.N.A., Van Soest, R.W.M. (2002).** Systema Porifera: A guide to the classification of sponges. Plenum Publishers, New York, N.Y, vol. 1.
- Hooper, J.N.A., Van Soest, R.W.M. (2003).** Systema Porifera: A Guide to the Classification of sponges. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 1810.
- Horiguchi, T. (2006a).** Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. *Environ. Sci.* 13(2): 77-87.
- Horiguchi, T., Kojima, M., Hamada, F., Kajikawa, A., Shiraishi, H., Morita, M., Shimizu, M. (2006b).** Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*Babylonia japonica*) populations. *Environ. Health. Perspect.* 114 Suppl 1: 13-9.
- Horiguchi, T., Kojima, M., Takiguchi, N., Kaya, M., Shiraishi, H., Morita, M. (2005).** Continuing observation of disturbed reproductive cycle and ovarian spermatogenesis in the giant abalone, *Haliotis madaka* from an organotin-contaminated site of Japan. *Mar. Pollut. Bull.* 51(8-12): 817-22.
- Huang, C., Ma, W.Y., Maxiner, A., Sun, Y., Dong, Z. (1999).** p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J. Biol. Chem.* 274(18): 12229-35.
- Huc, L., Tekpli, X., Holme, J.A., Rissel, M., Solhaug, A., Gardyn, C., Le Moigne, G., Gorria, M., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossmann, D. (2007).** c-Jun NH2-terminal

kinase-related Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 activation controls hexokinase II expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis. *Cancer. Res.* 67(4): 1696-705.

**Huet, M., Paulet, Y.M., Glémarec, M. (1996).** Tributyltin (TBT) Pollution in the coastal waters of West Brittany as indicated by imposex in *Nucella lapillus*. *Mar. Environ. Res.* 41(2): 157-167.

**Hung, W.J., Roberson, R.S., Taft, J., Wu, D.Y. (2003).** Human BAG-1 proteins bind to the cellular stress response protein GADD34 and interfere with GADD34 functions. *Mol. Cell. Biol.* 23(10): 3477-86.

**Hylland, K. (2006).** Biological effects in the management of chemicals in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 53(10-12): 614-9.

**Inoue, S., Oshima, Y., Nagai, K., Yamamoto, T., Go, J., Kai, N., Honjo, T. (2004).** Effect of maternal exposure to tributyltin on reproduction of the pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23(5): 1276-81.

**Inoue, S., Oshima, Y., Usuki, H., Hamaguchi, M., Hanamura, Y., Kai, N., Shimasaki, Y., Honjo, T. (2006).** Effects of tributyltin maternal and/or waterborne exposure on the embryonic development of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere.* 63(5): 881-8.

**Ito, Y., Mishra, N.C., Yoshida, K., Kharbanda, S., Saxena, S., Kufe, D. (2001).** Mitochondrial targeting of JNK/SAPK in the phorbol ester response of myeloid leukemia cells. *Cell. Death. Differ.* 8(8): 794-800.

**Jaksic, Z., Batel, R., Bihari, N., Micic, M., Zahn, R.K. (2005).** Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination--a long-term field study. *Mar. Pollut. Bull.* 50(11): 1314-27.

**Jaksic, Z., Batel, R. (2003).** DNA integrity determination in marine invertebrates by Fast Micromethod. *Aquat. Toxicol.* 65(4): 361-76.

**Janer, G., Bachmann, J., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Porte, C. (2006).** The effect of organotin compounds on gender specific androstenedione metabolism in the freshwater ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 99(2-3): 147-56.

**Janer, G., Mesia-Vela, S., Wintermyer, M.L., Cooper, K.R., Kauffman, F.C., Porte, C. (2004).** Esterification of vertebrate-like steroids in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Mar. Environ. Res.* 58(2-5): 481-4.

**Jorundsdottir, K., Svavarsson, J., Leung, K.M. (2005).** Imposex levels in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.)--continuing improvement at high latitudes. *Mar. Pollut. Bull.* 51(8-12): 744-49.



- Ka Imoussi, A., Chafik, A., Mouzdahir, A., Bakkas, S. (2001).** The impact of industrial pollution on the Jorf Lasfar coastal zone (Morocco, Atlantic Ocean): the mussel as an indicator of metal concentration. *Earth. Planet. Sci. Lett.* 333: 337-341.
- Kefaloyianni, E., Gaitanaki, C., Beis, I. (2006).** ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell. Signal.* 18(12): 2238-51.
- Kefaloyianni, E., Gourgou, E., Ferle, V., Kotsakis, E., Gaitanaki, C., Beis, I. (2005).** Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *J. Exp. Biol.* 208(Pt 23): 4427-36.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26(4): 239-57.
- .Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.N., Campbell, A., Sudha, T., Yuan, Z.M., Narula, J., Weichselbaum, R., Nalin, C., Kufe, D. (2000).** Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 275(1): 322-7.
- Kim, D.H., Ausubel, F.M. (2005).** Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Immunol.* 17(1): 4-10.
- Kim, J., Sharma, R.P. (2004).** Calcium-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and apoptosis in response to cadmium in murine macrophages. *Toxicol. Sci.* 81(2): 518-27.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T. (2007).** ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquat. Toxicol.* 85(2): 124-32.
- Kljaković-Gašpić, Odžak, N. , Zvonarić, T., Horvat, M., Barić, A. (2002).** Distribution of mercury and methyl mercury in tissues of transplanted mussels. 7<sup>th</sup> *Zorana International Conference on Mercury as a Global Pollutant*.
- Ko, L.J., Prives, C. (1996).** p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10(9): 1054-72.
- Koziol, C., Borojevic, R., Steffen, R., Muller, W.E. (1998).** Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech. Ageing. Dev.* 100(2): 107-20.
- Koziol, C., Wagner-Hülsmann, C., Mikoc, A., Gamulin, V., Kruse, M., Pancer, Z., Schäcke, H., Müller, W.E.G. (1996).** Cloning of a heat-inducible biomarker, the cDNA encoding the 70-kDa heat shock protein, from the marine sponge *Geodia cydonium*: response to natural stressors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 136: 153-161.

- Kramer, R.M., Roberts, E.F., Um, S.L., Borsch-Haubold, A.G., Watson, S.P., Fisher, M.J., Jakubowski, J.A. (1996).** p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J. Biol. Chem.* 271(44): 27723-9.
- Kruse, M., Muller, I.M., Muller, W.E. (1997).** Early evolution of metazoan serine/threonine and tyrosine kinases: identification of selected kinases in marine sponges. *Mol. Biol. Evol.* 14(12): 1326-34.
- Kruszewski, M., Green, M.H., Lowe, J.E., Szumiel, I. (1994).** DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4 degrees C and 37 degrees C in L5178Y sublines. *Mutat. Res.* 308(2): 233-41.
- Kubaneck, J., Whalen, K.E., Engel, S., Kelly, S.R., Henkel, T.P., Fenical, W., Pawlik, J.R. (2002).** Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges. *Oecologia*. 131: 125–136.
- Kuhn, H., and Borchert, A. (2002).** Free Rad. Biol. Med. (Paris) 33, 154–172.
- Kultz, D., Avila, K. (2001).** Mitogen-activated protein kinases are *in vivo* transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp. Biochem. Physiol B. Biochem. Mol. Biol.* 129(4): 821-9.
- Kurelec, B., Britvic, S., Krca, S., Muller, W.E., Zahn, R.K. (1987).** Metabolism of some carcinogenic aromatic amines in four species of marine sponges. *Comp. Biochem. Physiol C*. 86(1): 17-22.
- Kuwabara, M., Takahashi, K., Inanami, O. (2003).** Induction of apoptosis through the activation of SAPK/JNK followed by the expression of death receptor Fas in X-irradiated cells. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 44(3): 203-9.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (2001).** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81(2): 807-69.
- Kyriakis, J.M. (2000).** MAP kinases and the regulation of nuclear receptors. *Sci STKE* 2000(48): pe1.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (1996a).** Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays*. 18(7): 567-77.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (1996b).** Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* 271(40): 24313-6.
- Landvik, N.E., Gorria, M., Arlt, V.M., Asare, N., Solhaug, A., Lagadic-Gossmann, D., Holme, J.A. (2007).** Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel

exhaust particle extracts on cell signalling related to apoptosis: possible implications for their mutagenic and carcinogenic effects. *Toxicology*. 231(2-3): 159-74.

- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M. (2006).** Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79(3): 278-87.
- Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R., Pouyssegur, J. (1996).** Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 271(34): 20608-16.
- Leberer, E., Dignard, D., Marcus, D., Thomas, D.Y., Whiteway, M. (1992).** The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO. J.* 11(13): 4815-24.
- Lee, C.C., Hsieh, C.Y., Tien, C.J. (2006).** Factors influencing organotin distribution in different marine environmental compartments, and their potential health risk. *Chemosphere*. 65(4): 547-59.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., et al. (1994).** A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 372(6508): 739-46.
- Lee, S.W., Fang, L., Igarashi, M., Ouchi, T., Lu, K.P., Aaronson, S.A. (2000).** Sustained activation of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase cascade by the tumor suppressor p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 97(15): 8302-5.
- Lei, W., Yu, R., Mandlekar, S., Kong, A.N. (1998).** Induction of apoptosis and activation of interleukin 1beta-converting enzyme/Ced-3 protease (caspase-3) and c-Jun NH2-terminal kinase 1 by benzo(a)pyrene. *Cancer. Res.* 58(10): 2102-6.
- Le Marrec-Croq, F., Dorange, G. and Chesné, C. (1997-a). n° de publication : . (1997a).** Procédé de culture de cellules d'invertébrés marins et cultures obtenues - Brevet Fr n°9506921, 2735146 (1996).
- Lenormand, P. (1995).** The mammalian mitogen activated protein kinase network. *Clin. Mol. Pathol.* 48(6): M292-M301.
- Leung, K.M., Morley, N.J., Grist, E.P., Morritt, D., Crane, M. (2004).** Chronic toxicity of tributyltin on development and reproduction of the hermaphroditic snail *Physa fontinalis*: Influence of population density. *Mar. Environ. Res.* 58(2-5): 157-62.
- Li, J., Huang, C.Y., Zheng, R.L., Cui, K.R., Li, J.F. (2000).** Hydrogen peroxide induces apoptosis in human hepatoma cells and alters cell redox status. *Cell. Biol. Int.* 24(1): 9-23.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001).** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 412(6842): 95-9.

- Lim, M., Martinez, T., Jablons, D., Cameron, R., Guo, H., Toole, B., Li, J.D., Basbaum, C. (1998).** Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS. Lett.* 441(1): 88-92.
- Lindenboim, L., Yuan, J., Stein, R. (2000).** Bcl-xS and Bax induce different apoptotic pathways in PC12 cells. *Oncogene.* 19(14): 1783-93.
- Liu, S.M., Hsia, M.P., Huang, C.M. (2005).** Accumulation of butyltin compounds in cobia *Rachycentron canadum* raised in offshore aquaculture sites. *Sci Total Environ.*
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997).** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2): 175-84.
- Lockshin, R.A., Beaulaton, J. (1974a).** Programmed cell death. Cytochemical evidence for lysosomes during the normal breakdown of the intersegmental muscles. *J. Ultrastruct. Res.* 46(1): 43-62.
- Lockshin, R.A., Beaulaton, J. (1974b).** Programmed cell death. *Life Sci.* 15(9): 1549-65.
- Lockshin, R.A., Beaulaton, J. (1974c).** Programmed cell death. Cytochemical appearance of lysosomes when death of the intersegmental muscles is prevented. *J. Ultrastruct. Res.* 46(1): 63-78.
- Luchetti, F., Betti, M., Canonico, B., Arcangeletti, M., Ferri, P., Galli, F., Papa, S. (2009).** ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 46(3): 339-51.
- Makita, Y., Omura, M., Ogata, R. (2004).** Effects of perinatal simultaneous exposure to tributyltin (TBT) and p,p'-DDE [1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene] on male offspring of Wistar rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 67(5): 385-95.
- Makita, Y., Tanaka, A., Omura, M., Ogata, R. (2003).** Effects of simultaneous administration of tributyltin (TBT) and p,p'-DDE on female offspring of Wistar rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 66(24): 2337-47.
- Malagoli, D., Lusvardi, M., Gobba, F., Ottaviani, E. (2004).** 50 Hz magnetic fields activate mussel immunocyte p38 MAP kinase and induce HSP70 and 90. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 137(1): 75-9.
- Mandal, M., Olson, D.J., Sharma, T., Vadlamudi, R.K., Kumar, R. (2001).** Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 120(1): 71-8.

- Marigomez, I., Soto, M., Kortabitarte, M. (1996).** Tissue-level biomarkers and biological effect of mercury on sentinel slugs, *Arion ater*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31(1):
- Marshall, D.J., Rajkumar, A. (2003).** Imposex in the indigenous *Nassarius kraussianus* (Mollusca: Neogastropoda) from South African harbours. *Mar. Pollut. Bull.* 46(9): 1150-5.
- Masuda, K., Shima, H., Katagiri, C., Kikuchi, K. (2003).** Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446. *J. Biol. Chem.* 278(34): 32448-56.
- McIntosh, A.D., Moffat, C.F., Packer, G., Webster, L. (2004).** Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) concentration and composition determined in farmed blue mussels (*Mytilus edulis*) in a sea loch pre- and post-closure of an aluminium smelter. *J. Environ. Monit.* 6(3): 209-18.
- Meng, P.J., Wang, J.T., Liu, L.L., Chen, M.H., Hung, T.C. (2005).** Toxicity and bioaccumulation of tributyltin and triphenyltin on oysters and rock shells collected from Taiwan mariculture area. *Sci. Total Environ.* 349(1-3): 140-9.
- Merienne, K., Helmlinger, D., Perkin, G.R., Devys, D., Trottier, Y. (2003).** Polyglutamine expansion induces a protein-damaging stress connecting heat shock protein 70 to the JNK pathway. *J. Biol. Chem.* 278(19): 16957-67.
- Micic, M., Bihari, N., Jaksic, Z., Muller, W.E., Batel, R. (2002).** DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 53(3): 243-62.
- Micic, M., Bihari, N., Labura, Z., Muller, W.E., Batel, R. (2001).** Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquat. Toxicol.* 55(1-2): 61-73.
- Mignotte, B., Vayssiere, J.L. (1998).** Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 252(1): 1-15.
- Milivojevič, T., Milačič, R., Ščančar, J. (2008).** A Survey of Organotin Compounds in the Northern Adriatic Sea. *Water, Air, & Soil Pollution*, Vol. 196, N° 1-4, p 211-224.
- Minn, A.J., Boise, L.H., Thompson, C.B. (1996).** Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J. Biol. Chem.* 271(11): 6306-12.
- Mizukami, Y., Yoshida, K. (1997).** Mitogen-activated protein kinase translocates to the nucleus during ischaemia and is activated during reperfusion. *Biochem. J.* 323 ( Pt 3): 785-90.
- Molnar, A., Theodoras, A.M., Zon, L.I., Kyriakis, J.M. (1997).** Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J. Biol. Chem.* 272(20): 13229-35.
- Monserat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M., Pinho, G.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A. (2007).**

Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146(1-2): 221-34.

- Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R.J., Shirasaki, Y., Greenberg, M.E. (2001).** Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J. Neurosci.* 21(19): 7551-60.
- Müller, W.E.G., Custódio, M.R., Wiens, M., Zilberberg, C., Châtel, A., Müller, I., Schröder, H.C., (2009).** Effect of bacterial infection on stem cell pattern in Porifera. Baruch, B, Valeria V. (Org.). Stem cells in marine organisms. Berlin: Springer, p. 1-28.
- Müller, W.E., Batel, R., Schroder, H.C., Muller, I.M. (2004).** Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part I-the History: Sustainable Exploitation of Biodiversity (Sponges and Invertebrates) in the Adriatic Sea in Rovinj (Croatia). *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 1(1): 71-82.
- Müller, W.E., Krasko, A., Le Pennec, G., Steffen, R., Wiens, M., Ammar, M.S., Muller, I.M., Schroder, H.C. (2003).** Molecular mechanism of spicule formation in the demosponge *Suberites domuncula*: silicatein--collagen--myotrophin. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 33: 195-221.
- Müller, W.E., Bohm, M., Grebenjuk, V.A., Skorokhod, A., Muller, I.M., Gamulin, V. (2002).** Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans. *Gene* 295(2): 299-309.
- Müller, W.E. (2001).** Review: How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 129(2-3): 433-60.
- Miller, E., Burger-Kentischer, A., Neuhofer, W., Fraek, M.L., Marz, J., Thureau, K., Beck, F.X. (1999).** Possible involvement of heat shock protein 25 in the angiotensin II-induced glomerular mesangial cell contraction via p38 MAP kinase. *J Cell Physiol.* 181(3): 462-9.
- Müller W.E.G, Schröder H.C. (1999).** 14-3-3 proteins used as sensitive biological markers for detecting pollution caused, inter alia, by polychlorinated biphenyl (pcb) and (xeno)oestrogen (WO/1999/046401)
- Müller, W.E. (1998).** Origin of Metazoa: sponges as living fossils. *Naturwissenschaften* 85(1): 11-25.
- Müller, W.E.G., Batel, R., Zahn, R.K., Bihari, N., Schröder, H.C. (1997).** Mikro-Methode zur Schnellbestimmung von DNA-Schäden und deren Reparatur unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Picogreen und ihre Anwendung. *Patent application.* 19724781.4.
- Müller, W.E.G., Batel, R., Bihari, N., Rinkevich, B., Dapper, J., Schäcke, H. (1994).** Organotin-induced apoptosis is modulated by the water pollutant methyl mercury. *Use of aquatic invertebrates as tools for monitoring of environmental hazards*, Müller, W.E.G. (ed.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Munnik, T., Meijer, H.J. (2001).** Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Lett.* 498(2-3): 172-8.

- Nacci, D.E., Nelson, S., Nelson, W., Jackim, E., (1992).** Application of the alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Mar. Environ. Res.* 33, 38–100.
- Nagata, S. (2000).** Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256(1): 12-8.
- Nakatsu, Y., Kotake, Y., Ohta, S. (2007).** Concentration dependence of the mechanisms of tributyltin-induced apoptosis. *Toxicol. Sci.* 97(2): 438-47.
- Narbonne, J.F., Daubèze, M., Clérandeau, C., Garrigues, P. (1999).** Scale classification based on biochemical markers in mussel application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers.* 4 (6) : 415-424.
- Negri, A., Burns, K., Boyle, S., Brinkman, D., Webster, N. (2006).** Contamination in sediments, bivalves and sponges of McMurdo Sound, Antarctica. *Environ. Pollut.* 143(3): 456-67.
- Nevo, E. (2001).** Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98(11): 6233-40.
- Nicholas K. B., Nicholas H. B., Deerfield D. W. (1997).** GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation *EMBNEW. NEWS*, Vol. 4
- Nishikawa, J., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F., Horiguchi, T. (2004).** Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ. Sci. Technol.* 38(23): 6271-6.
- Nishikawa, T., Nakamura, T., Fukushima, A., Takagi, Y. (2005).** Further evaluation of the skin micronucleus test: results obtained using 10 polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 588(1): 58-63.
- Noguchi, K., Kitanaka, C., Yamana, H., Kokubu, A., Mochizuki, T., Kuchino, Y. (1999).** Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 274(46): 32580-7.
- Oehlmann, J., Markert, B., Stroben, E., Schulte-Oehlmann, U., Bauer, B., Fioroni, P. (1996).** Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 354(5-6): 540-5.
- Ohji, M., Arai, T., Miyazaki, N. (2005).** Acute toxicity of tributyltin to the Caprellidea (Crustacea: Amphipoda). *Mar. Environ. Res.* 59(3): 197-201.
- Oliver, L.M., Fisher, W.S., Volety, A.K., Malaeb, Z. (2003).** Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquat. Toxicol.* 64(4): 363-73.

- Oliver, L.M., Fisher, W.S., Winstead, J.T., Hemmer, B.L., Long, E.R. (2001).** Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquat. Toxicol.* 55(3-4): 203-22.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Sole, M., Porte, C., Cajaraville, M.P. (2002).** Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* 58(1-2): 75-98.
- Orlov, Y.A. (1971).** Fundamentals of palaeontology, vol II. Israel program for the Scientific Translations, Jerusalem, p11.
- Owuor, E.D., Kong, A.N. (2002).** Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 64(5-6): 765-70.
- Pagliarani, A., Bandiera, P., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M., Nesci, S., Borgatti, A.R. (2008).** Tributyltin (TBT) inhibition of oligomycin-sensitive Mg-ATPase activity in mussel mitochondria. *Toxicol. In Vitro* 22(4): 827-36.
- Palomba, L., Sestili, P., Columbaro, M., Falcieri, E., Cantoni, O. (1999).** Apoptosis and necrosis following exposure of U937 cells to increasing concentrations of hydrogen peroxide: the effect of the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Biochem. Pharmacol.* 58(11): 1743-50.
- Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S., Pouyssegur, J. (1993).** Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(18): 8319-23.
- Park, J., Liu, A.Y. (2001).** JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response. *J. Cell Biochem.* 82(2): 326-38.
- Parsons, P.A. (2005).** Environments and evolution: interactions between stress, resource inadequacy and energetic efficiency. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 80(4): 589-610.
- Patel, B., Balani, M.C., Patel, S. (1985).** Sponge 'sentinel' of heavy metals. *Sci. Total Environ.* 41(2): 143-52.
- Pawlik, J., Chanas, B., Toonen, R., Fenical, W. (1995).** Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish: I. Chemical deterrence. *MEPS* 127: 183-194.
- Pelengaris, S., Rudolph, B., Littlewood, T. (2000).** Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10(1): 100-5.
- Pelkonen, O., Nebert, D.W. (1982).** Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34(2): 189-222.
- Pelletier, E., Sargian, P., Payet, J., Demers, S. (2006).** Ecotoxicological Effects of Combined UVB. *Photochem. Photobiol.* 82(4):981-93.



- Pellizzato, F., Centanni, E., Marin, M.G., Moschino, V., Pavoni, B. (2004).** Concentrations of organotin compounds and imposex in the gastropod *Hexaplex trunculus* from the Lagoon of Venice. *Sci. Total Environ.* 332(1-3): 89-100.
- Pennec, J.P., Gallet, M., Gioux, M. and Dorange, G. (2002).** Cell culture of bivalves: tool for the study of the effects of environmental stressors. *Cell. Mol. Biol.* 48 (4): 351-358.
- Pennec, J.P., Talarmin, H., Droguet, M., Giroux-Metges, M.A., Gioux, M. and Dorange, G. (2004).** Characterization of the voltage-activated currents in cultured atrial myocytes isolated from the heart of the common oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Biol.* 207 (Pt 22): 3935-3944.
- Perez-Cadahia, B., Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J. (2004).** Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 138(4): 453-60.
- Perez, T., Longet, D., Schembri, T., Rebouillon, P., Vacelet, J. (2005).** Effects of 12 years' operation of a sewage treatment plant on trace metal occurrence within a Mediterranean commercial sponge (*Spongia officinalis*, Demospongiae). *Mar. Pollut. Bull.* 50(3): 301-9.
- Perez, T., Wafo, E., Fourt, M., Vacelet, J. (2003).** Marine sponges as biomonitor of polychlorobiphenyl contamination: concentration and fate of 24 congeners. *Environ. Sci. Technol.* 37(10): 2152-8.
- Perugini, M., Visciano, P., Manera, M., Turno, G., Lucisano, A., Amorena, M. (2007).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Gulf of Naples, Tyrrhenian Sea. *J. Agric. Food Chem.* 55(5): 2049-54.
- Philips, D. J. H. (1977).** The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. *Rev. Environ. Pollut.* 13: 281-317.
- Philips, D.J.H., Rainbow, P.S. (1994).** Biomonitoring of trace aquatic contaminants. *Environmental Management Series*, Chapman & Hall, London, p. 371.
- Philips, D. J. H., Segar, D. A. (1986).** Use of indicators in monitoring conservative contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 17: 10-17.
- Phillips, G.R., Lenhart, T.E., Gregory, R.W. (1980).** Relation between trophic position and mercury accumulation among fishes from the Tongue River Reservoir, Montana. *Environ. Res.* 22(1): 73-80.
- Phillips D.J.H. (1976)** The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Mar. Biol.* 38:56-59
- Pietersma, A., Tilly, B.C., Gaestel, M., de Jong, N., Lee, J.C., Koster, J.F., Sluiter, W. (1997).** p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230(1): 44-8.

- Pile, A.J., Patterson, M.R., Witman, J.D. (1996).** In situ grazing on plankton G10 mm by the boreal sponge *Mycale lingua*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141: 95–102.
- Pirger, Z., Nemeth, J., Hiripi, L., Toth, G., Kiss, P., Lubics, A., Tamas, A., Hernadi, L., Kiss, T., Reglodi, D. (2008).** PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia*. *J. Mol. Neurosci.* 36(1-3): 105-14.
- Porte, C., Sole, M., Albaiges, J., Livingstone, D.R. (1991).** Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of *Mytilus sp.* to organic pollution. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 100(1-2): 183-6.
- Prevodnik, A., Gardestrom, J., Lilja, K., Elfving, T., McDonagh, B., Petrovic, N., Tedengren, M., Sheehan, D., Bollner, T. (2007).** Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. *Aquat. Toxicol.* 82(1): 63-71.
- Prives, C., Hall, P.A. (1999).** The p53 pathway. *J. Pathol.* 187(1): 112-26.
- Pruell, R.J., Lake, J. L., Davis, W. R., Quinn, J. G. (1986).** Uptake and depuration of organic contaminants by blue mussels (*Mytilus edulis*). Exposed to Environmentally Contaminated Sediment. *Mar. Biol.* 91: 497-508.
- Pruski, A.M., Dixon, D.R. (2002).** Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol.* 57(3): 127-37.
- Rafiee, P., Shi, Y., Pritchard, K.A., Jr., Ogawa, H., Eis, A.L., Komorowski, R.A., Fitzpatrick, C.M., Tweddell, J.S., Litwin, S.B., Mussatto, K., Jaquiss, R.D., Baker, J.E. (2003).** Cellular redistribution of inducible Hsp70 protein in the human and rabbit heart in response to the stress of chronic hypoxia: role of protein kinases. *J. Biol. Chem.* 278(44): 43636-44.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J. (1995).** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270(13): 7420-6.
- Rank, J. (2009).** Intersex in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72(4): 1271-7.
- Rao, J.V., Kavitha, P., Reddy, N.C., Rao, T.G. (2006).** *Petrosia testudinaria* as a biomarker for metal contamination at Gulf of Mannar, southeast coast of India. *Chemosphere* 65(4): 634-8.
- Regoli, F., Orlando, E. (1993).** *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses. *Sci. Total Environ.* 2: 1283-1292.
- Regoli, L., Chan, H.M., de Lafontaine, Y., Mikaelian, I. (2001).** Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec City Harbour area of the St. Lawrence River. *Aquat. Toxicol.* 53(2): 115-26.

- Reiswig, H.M. (1971).** Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biol. Bull.* 141:191-226.
- Reiswig, H. M. (1975).** The aquiferous systems of three marine *Demospongiae*. *J. Morphol.* 145:493-502
- Ribes, M., Coma, R., Gili, J.M. (1999).** Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 176: 179–190.
- Rigby, J.K. (1987).** Phylum Porifera. *Fossil Invertebrates*, In Boardman RS, Cheetham AH, Rowell AJ (eds). Berlin. Blackwell Science.
- Robinson, M.J., Cobb, M.H. (1997).** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 180-6.
- Rodemann, H.P., Bamberg, M. (1995).** Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother. Oncol.* 35(2): 83-90.
- Rossomando, A.J., Payne, D.M., Weber, M.J., Sturgill, T.W. (1989).** Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86(18): 6940-3.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R. (1994).** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78(6): 1027-37.
- Roux, P.P., Blenis, J. (2004).** ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(2): 320-44.
- Royuela, M., Arenas, M.I., Bethencourt, F.R., Sanchez-Chapado, M., Fraile, B., Paniagua, R. (2002).** Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Hum. Pathol.* 33(3): 299-306.
- Rummel, A.M., Trosko, J.E., Wilson, M.R., Upham, B.L. (1999).** Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junctional intercellular communication and stimulated MAPK activity. *Toxicol. Sci.* 49(2): 232-40.
- Ruppert, E.E., Fox, R.S. & Barnes, R.D. (2004).** Invertebrate Zoology. Seventh Edition. Thomson, Brooks/Cole.: vii-xvii, 1-963, I1-I26.
- Sancar, A. (1996).** DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 43-81.
- Santos, M.M., Castro, L.F., Vieira, M.N., Micael, J., Morabito, R., Massanisso, P., Reis-Henriques, M.A. (2005).** New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 141(1): 101-9.

- Sarma, A.S., Daum, T., Müller, W.E.G. (1993).** Secondary metabolites from marine sponges. Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt, Ullstein-Mosby Verlag, Berlin, Germany.
- Scancar, J., Zuliani, T., Turk, T., Milacic, R. (2007).** Organotin compounds and selected metals in the marine environment of Northern Adriatic sea. *Environ. Monit. Assess.* 127(1-3): 271-82.
- Scheffer, U., Krasko A., Pancer Z., Mfiller W.E.G. (1997).** High conservation of the serum response factor within Metazoa: cDNA from the sponge *Geodia cydonium*. *Biol. J. Linnean. Soc.* 61 127-137.
- Schmidt, E.W., Obratzsova, A.Y., Davidson, S.K., Faulkner, D.J., Haygood, M.G. (2000).** Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel  $\delta$ -proteobacterium, "*Candidatus Entotheonella palauensis*." *Mar. Biol.* 136:969–977.
- Schröder, H.C., Brummer, F., Fattorusso, E., Aiello, A., Menna, M., de Rosa, S., Batel, R., Muller, W.E. (2003).** Sustainable production of bioactive compounds from sponges: primmorphs as bioreactors. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 37: 163-97.
- Schröder, H.C., Hassanein, H.M., Lauenroth, S., Koziol, C., Mohamed, T.A., Lacorn, M., Steinhart, H., Batel, R., Muller, W.E. (1999).** Induction of DNA strand breaks and expression of HSP70 and GRP78 homolog by cadmium in the marine sponge *Suberites domuncula*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36(1): 47-55.
- Schutze, J., Skorokhod, A., Muller, I.M., Muller, W.E. (2001).** Molecular evolution of the metazoan extracellular matrix: cloning and expression of structural proteins from the demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *J. Mol. Evol.* 53(4-5): 402-15.
- Schwabe, R.F., Bradham, C.A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B.L., Schoonhoven, R., Brenner, D.A. (2003).** c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 37(4): 824-32.
- Scott, A., Haystead, C.M., Haystead, T.A. (1995).** Purification of a 12,020-dalton protein that enhances the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 270(41): 24540-7.
- Seger, R., Seger, D., Lozeman, F.J., Ahn, N.G., Graves, L.M., Campbell, J.S., Ericsson, L., Harrylock, M., Jensen, A.M., Krebs, E.G. (1992).** Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J. Biol. Chem.* 267(36): 25628-31.
- Seinen, W., Helder, T., Vernij, H., Penninks, A., Leeuwangh, P. (1981).** Short term toxicity of tri-nbutyltin chloride in rainbow trout (*Salmo gairdneri* - Richardson) yolk sac fry. *Sci. Total. Environ.* 19:155-166.
- Sekulic, B., Vertacnik, A. (1996).** Balance of Average Annual Fresh Water Inflow into the Adriatic Sea. *Int. J. Water Resour. Dev.* 12 (2): 89-98.

- Seo, Y.R., Jung, H.J. (2004).** The potential roles of p53 tumor suppressor in nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER). *Exp. Mol. Med.* 36(6): 505-9.
- Shida, K., Terajima, D., Uchino, R., Ikawa, S., Ikeda, M., Asano, K., Watanabe, T., Azumi, K., Nonaka, M., Satou, Y., Satoh, N., Satake, M., Kawazoe, Y., Kasuya, A. (2003).** Hemocytes of *Ciona intestinalis* express multiple genes involved in innate immune host defense. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302(2): 207-18.
- Simpson, T.L. (1984).** The Cell Biology of Sponges. *Springer-Verlag*, New York.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988).** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175(1): 184-91.
- Siu, W.H., Cao, J., Jack, R.W., Wu, R.S., Richardson, B.J., Xu, L., Lam, P.K. (2004).** Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquat. Toxicol.* 66(4): 381-92.
- Skarphedinsdottir, H., Ericson, G., Svavarsson, J., Naes, K. (2007).** DNA adducts and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) tissue levels in blue mussels (*Mytilus spp.*) from Nordic coastal sites. *Mar. Environ. Res.* 64(4): 479-91.
- Smith, M.L., Ford, J.M., Hollander, M.C., Bortnick, R.A., Amundson, S.A., Seo, Y.R., Deng, C.X., Hanawalt, P.C., Fornace, A.J., Jr. (2000).** p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol. Cell. Biol.* 20(10): 3705-14.
- Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes, F.M. (2004).** Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Exp. Biol.* 207(Pt 19): 3369-80.
- Sokolova, I.M. (2009).** Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal* 6: 49-58 (invited review).
- Sole, M., Porte, C., Albaiges, J. (1994).** Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens. *Aquat. Toxicol.* 30: 271-283.
- Solhaug, A., Refsnes, M., Holme, J.A. (2004).** Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in Hepa1c1c7 cells. *J. Cell. Biochem.* 93(6): 1143-54.
- Song, Y.C., Woo, J.H., Park, S.H., Kim, I.S. (2005).** A study on the treatment of antifouling paint waste from shipyard. *Mar. Pollut. Bull.* 51(8-12): 1048-53.
- Sordet, O., Khan, Q.A., Kohn, K.W., Pommier, Y. (2003).** Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 3(4): 271-90.

- Stasinakis, A.S., Thomaidis, N.S., Nikolaou, A., Kantifes, A. (2005).** Aerobic biodegradation of organotin compounds in activated sludge batch reactors. *Environ. Pollut.* 134(3): 431-8.
- Steindler, L., Beer, S., and Ilan, M. (2002).** Photosymbiosis in intertidal and subtidal tropical sponges. Tilzer, M. M., and Dubinsky, ...Biodata of Noga Stambler and Zvy Dubinsky authors of "Marine ... Symbiosis 33, 263–273.
- Strandenes, S.P. (2000).** The second order effects on commercial shipping of restrictions on the use of TBT. *Sci. Total Environ.* 258(1-2): 111-7.
- Suehiro, F., Kobayashi, T., Nonaka, L., Tuyen, B.C., Suzuki, S. (2006).** Degradation of tributyltin in microcosm using mekong river sediment. *Microb. Ecol.* 52(1): 19-25.
- Sunila, I., LaBanca, J. (2003).** Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Organ* 56(2): 163-70.
- Tairova, Z.M., Giessing, A.M., Hansen, R., Andersen, O. (2009).** 1-Hydroxypyrene as a biomarker of PAH exposure in the marine polychaete *Nereis diversicolor*. *Mar. Environ. Res.* 67(1): 38-46.
- Tait, S.W., Green, D.R. (2008).** Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27(50): 6452-61.
- Takenaka, K., Moriguchi, T., Nishida, E. (1998).** Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science* 280(5363): 599-602.
- Talarmin, H. and Droguet, M., Pennec, J.P., Schröder, H.C., Dorange, G. (2009).** Induction of cell death by tributyltin in oyster heart cells *Toxicol. Sci.*
- Talarmin, H., M. Droguet, J.P. Pennec, H.C. Schröder, W.E.G. Müller, M. Gioux and G. Dorange (2008):** Effects of a phycotoxin, okadaic acid, on oyster heart cell survival. *Toxicol. Environm. Chem.* 90: 153-168.
- Talarmin, H., Rescan, C., Cariou, S., Glaise, D., Zanninelli, G., Bilodeau, M., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C., Baffet, G. (1999).** The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 19(9): 6003-11.
- Taylor, L.K., Wang, H.C., Erikson, R.L. (1996).** Newly identified stress-responsive protein kinases, Krs-1 and Krs-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93(19): 10099-104.
- Terahara, K., Takahashi, K.G. (2008).** Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Curr. Pharm. Des.* 14(2): 131-7.
- Thacker, R.W., Starnes, S. (2003).** Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongeliae* in marine sponge, *Dysides* spp. *Mar. Biol.* 142: 643–648.
- Thomas, R.E., Lindeberg, M., Harris, P.M., Rice, S.D. (2007).** Induction of DNA strand breaks in the mussel (*Mytilus trossulus*) and clam (*Protothaca staminea*) following

chronic field exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from the Exxon Valdez spill. *Mar. Pollut. Bull.* 54(6): 726-32.

**Torres-Bugarin, O., De Anda-Casillas, A., Ramirez-Munoz, M.P., Sanchez-Corona, J., Cantu, J.M., Zuniga, G. (1998).** Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat. Res.* 413(3): 277-81.

**Torres, Y.R., Berlinck, R.G., Nascimento, G.G., Fortier, S.C., Pessoa, C., de Moraes, M.O. (2002).** Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon* 40(7): 885-91.

**Tort, M. J., Pasnik, D. J., Fernandez-Cobas, C., Wooster, G. A., and Bowser, P. R. (2002).** Quantitative Scoring of Gill Pathology of Walleyes Exposed to Hydrogen Peroxide. *J. Aquat. Anim. Health* 14:2, 154-159.

**Treinies, I., Paterson, H.F., Hooper, S., Wilson, R., Marshall, C.J. (1999).** Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal to stimulate DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 19(1): 321-9.

**Tu, V.C., Bahl, J.J., Chen, Q.M. (2003).** Distinct roles of p42/p44(ERK) and p38 MAPK in oxidant-induced AP-1 activation and cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc. Toxicol.* 3(2): 119-33.

**Turon, X., Galera, J., Uriz, M.J. (1997).** Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *J. Exp. Zool.* 278: 22-36.

**Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. (1994).** Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 6(1): 125-30.

**Urushibara, N., Mitsuhashi, S., Sasaki, T., Kasai, H., Yoshimizu, M., Fujita, H., Oda, A. (2009).** JNK and p38 MAPK are independently involved in tributyltin-mediated cell death in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTG-2 cells. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 149(4): 468-75.

**Vacelet, J., Donadey, C. (1977).** Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol* 30: 301-314.

**Valentine, J. W. (1994).** The Cambrian explosion. Pp. 401-412 in *Early Life on Earth*, S. Bengtson, ed. Columbia University Press, New York.

**van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R., Vandenabeele, P. (2001).** Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.* 8(12): 1136-42.

**Veltman, K., Huijbregts, M.A., van den Heuvel-Greve, M.J., Vethaak, A.D., Hendriks, A.J. (2006).** Organotin accumulation in an estuarine food chain: comparing field measurements with model estimations. *Mar. Environ. Res.* 61(5): 511-30.

- Venier, P., Pallavicini, A., De Nardi, B., Lanfranchi, G. (2003).** Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* 314: 29-40.
- Venier, P., Maron, S., Canova, S. (1997).** Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. *Mutat. Res.* 390(1-2): 33-44.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R. (1991).** Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 100(1-2): 187-90.
- Viglino, L., Pelletier, E., Lee, L.E. (2006).** Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and Imposex occurrence in common whelk (*Buccinum undatum*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50(1): 45-59.
- Visvardis, E.E., Tassiou, A.M., Piperakis, S.M. (1997).** Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gamma-irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 383(1): 71-80.
- Vogel, S. (1977).** Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74(5): 2069-71.
- Volkman. (2006).** Biomarkers, isotopes and DNA 1. *Marine organic matter. Wat. Res.* 29 (8): 1877-1884.
- Volloch, V., Gabai, V.L., Rits, S., Force, T., Sherman, M.Y. (2000).** HSP72 can protect cells from heat-induced apoptosis by accelerating the inactivation of stress kinase JNK. *Cell Stress Chaperones* 5(2): 139-47.
- Von Gise, A., Lorenz, P., Wellbrock, C., Hemmings, B., Berberich-Siebelt, F., Rapp, U.R., Troppmair, J. (2001).** Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Mol. Cell. Biol.* 21(7): 2324-36.
- Von Sonntag C. 1987.** New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radic. Res. Commun.* 2: 217-24.
- Wang, X., Rao, J., Studzinski, G.P. (2000).** Inhibition of p38 MAP kinase activity up-regulates multiple MAP kinase pathways and potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced differentiation of human leukemia HL60 cells. *Exp. Cell. Res.* 258(2): 425-37.
- Wang, Y., Wang, C., Zhang, J., Chen, Y., Zuo, Z. (2009).** DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastiscus marmoratus* liver. *Aquat. Toxicol.* 95(2): 93-8.
- Weber, J.D., Raben, D.M., Phillips, P.J., Baldassare, J.J. (1997).** Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem. J.* 326 (Pt 1): 61-8.



- Webster, N.S., Webb, R.I., Ridd, M.J., Hill, R.T., Negri, A.P. (2001).** The effects of copper on the microbial community of a coral reef sponge. *Environ. Microbiol.* 3(1): 19-31.
- Webster, N. S., Negri, A. P., Webb, R. I., Hill, R. T. (2002).** A spongin-boring  $\alpha$ -proteobacterium is the etiological agent of disease in the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 232: 305-309.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F. (2007).** Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85(2): 133-42.
- Weston, C.R., Davis, R.J. (2002).** The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12(1): 14-21.
- Whitfield, J. (2001).** Behavioural ecology. Down on fungal farm. *Nature* 411(6837): 536.
- Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. (1996).** Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 74(10): 589-607.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999).** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79(1): 143-80.
- Wiens, M., Korzhev, M., Perovic-Ottstadt, S., Luthringer, B., Brandt, D., Klein, S., Muller, W.E. (2007).** Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (demospongiae: Porifera). *Mol. Biol. Evol.* 24(3): 792-804.
- Wiens, M., Krasko, A., Perovic, S., Muller, W.E. (2003).** Caspase-mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1593(2-3): 179-89.
- Wiens, M., Diehl-Seifert, B., Muller, W.E. (2001).** Sponge Bcl-2 homologous protein (BHP2-GC) confers distinct stress resistance to human HEK-293 cells. *Cell Death Differ.* 8(9): 887-98.
- Wiens, M., Krasko, A., Muller, C.I., Muller, W.E. (2000).** Molecular evolution of apoptotic pathways: cloning of key domains from sponges (Bcl-2 homology domains and death domains) and their phylogenetic relationships. *J. Mol. Evol.* 50(6): 520-31.
- Wilkinson, C.R. (1983).** Net Primary Productivity in Coral Reef Sponges. *Science* 219(4583): 410-412.
- Wilkinson, C., Garrone, R. (1980).** Ultrastructure of siliceous spicules and microsclerocytes in the marine sponge *Neofibularia irata* N. SP. *J. Morphol.* 166(1): 51-63.

- Wilkinson, C. (1978).** Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology* 49(2): 161-167.
- Witorsch, R.J. (2002).** Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36(1): 118-30.
- Wolfe, D. A. (1991).** Choosing indicators of potential bioeffects from toxic contaminants for application in marine environmental monitoring programs (abstr.) *Program and Abstracts of the First International Ocean Pollution Symposium*, April/28 -May 3, 1991, Mayaguez, Puerto Rico. pp.58-59.
- Wood, K.W., Sarnecki, C., Roberts, T.M., Blenis, J. (1992).** ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* 68(6): 1041-50.
- Wright, J.H., Munar, E., Jameson, D.R., Andreassen, P.R., Margolis, R.L., Seger, R., Krebs, E.G. (1999).** Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96(20): 11335-40.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E. (1995).** Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240): 1326-31.
- Xu, D., Wang, L., Olson, J.E., Lu, L. (2001).** Asymmetrical response of p38 kinase activation to volume changes in primary rat astrocytes. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 226(10): 927-33.
- Yang, E.S., Burnstein, K.L. (2003).** Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 278(47): 46862-8.
- Yee, A.S., Paulson, E.K., McDevitt, M.A., Rieger-Christ, K., Summerhayes, I., Berasi, S.P., Kim, J., Huang, C.Y., Zhang, X. (2004).** The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* 336(1): 1-13.
- Yu, Z.P., Matsuoka, M., Wispriyono, B., Iryo, Y., Igisu, H. (2000).** Activation of mitogen-activated protein kinases by tributyltin in CCRF-CEM cells: role of intracellular Ca(2+). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168(3): 200-7.
- Zahn, R.K., Zahn, G., Müller, W.E., Kurelec, B., Rijavec, M., Batel, R., Given, R. (1981).** Assessing consequences of marine pollution by hydrocarbons using sponges as model organisms. *Sci. Total. Environ.* 20(2): 147-69.
- Zhan, Q., Jin, S., Ng, B., Plisket, J., Shangary, S., Rathi, A., Brown, K.D., Baskaran, R. (2002).** Caspase-3 mediated cleavage of BRCA1 during UV-induced apoptosis. *Oncogene* 21(34): 5335-45.

- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B.T., Roeder, R.G. (2002).** The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol. Cell.* 9(3): 611-23.
- Zhang, J.H., Xu, M. (2000).** DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res.* 10(3): 205-11.
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., Xu, J.R. (2002).** Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2): 532-8.
- Zhang, Y., Qiu, W.J., Chan, S.C., Han, J., He, X., Lin, S.C. (2002).** Casein kinase I and casein kinase II differentially regulate axin function in Wnt and JNK pathways. *J. Biol. Chem.* 277(20): 17706-12.
- Zhuang, S., Demirs, J.T., Kochevar, I.E. (2000).** p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 275(34): 25939-48.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Blumenstein, M., Kafferlein, E., Kieper, D., Petersmann, I., Endres, S., Flegel, W.A., Northoff, H., Riethmuller, G., Haas, J.G. (1992).** In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion. *Immunology* 75(2): 264-8.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Strobel, M., Kieper, D., Fingerle, G., Schlunck, T., Petersmann, I., Ellwart, J., Blumenstein, M., Haas, J.G. (1992).** Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 79(2): 503-11.
- Zrouri, H., Le Goascogne, C., Li, W.W., Pierre, M., Courtin, F. (2004).** The role of MAP kinases in rapid gene induction after lesioning of the rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci* 20(7): 1811-8.

## RESUME

L'objectif de travail a été d'évaluer l'effet de deux types de polluants, le tributylétain (TBT) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), sur l'activation de la voie des MAP kinases et sur l'induction de l'apoptose chez deux invertébrés marins, la moule *Mytilus galloprovincialis* et l'éponge *Suberites domuncula*. Il a été montré, chez ces deux espèces exposées aux deux composés, une activation systématique de p38 en réponse à toutes les conditions expérimentales testées. JNK est également activée suite à leur exposition au TBT. En revanche, une exposition aux HAPs, dans les conditions expérimentales choisies, induit l'activation de JNK, chez la moule et de ERK, chez l'éponge. En outre, une induction de l'expression de Bcl-xS a été observée chez la moule, protéine impliquée dans la voie intrinsèque de l'apoptose. Chez l'éponge, l'induction de l'apoptose est dépendante de l'activation de la caspase 3 alors que chez la moule, comme chez d'autres bivalves, le processus apoptotique n'est dépendant de la caspase 3 que pour certaines concentrations de polluant. Par ailleurs, l'analyse des échantillons de moules prélevées *in situ* dans dix neuf stations de la côte adriatique (Croatie), polluées à des degrés divers notamment par le TBT et les HAPs, durant l'hiver et l'été, a montré une activation des trois MAPKs p38, JNK et ERK. Le niveau d'activation est corrélé au degré de pollution et à la température. Pour conclure, ce travail permet de noter l'intérêt de la p38 comme biomarqueur d'exposition et celui de l'apoptose comme marqueur d'effet.

**MOTS-CLES : MAP kinase, biomarqueur, *Mytilus galloprovincialis*, *Suberites domuncula*, apoptose**

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of two types of pollutants, Tributyltin (TBT) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), on MAP kinase signaling pathway activation and on apoptosis induction, on two marine invertebrates, the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the sponge *Suberites domuncula*. It was shown that animal exposure to both chemicals depicted p38 activation for all tested experimental conditions. JNK was also activated after exposure to TBT, while for HAPs exposure, JNK was activated in the mussel while ERK was activated in the sponge. Moreover, an induction of Bclx-S was observed in the mussel, protein involved in the apoptosis intrinsic pathway. In the sponge, apoptosis was caspase 3-dependent while in the mussel, apoptosis was dependent of caspase 3 induction only for some pollutant concentrations. In addition, analysis of mussels collected in situ in 19 stations of the Adriatic coast (Croatia), more or less polluted with TBT and HAPs, during winter and summer, showed an activation of the three MAP kinases p38, JNK and ERK. Activation level was correlated to the level of pollution and to the temperature. To conclude, this study had demonstrated the interest of using p38 as exposure biomarker and apoptosis as effect biomarker.

**KEYWORDS : MAP kinase, biomarker, *Mytilus galloprovincialis*, *Suberites domuncula*, apoptosis**

## Chapter 13

# Effect of Bacterial Infection on Stem Cell Pattern in Porifera

Werner E.G. Müller, Márcio Reis Custódio, Matthias Wiens, Carla Zilberberg, Amélie Châtel, Isabel M. Müller, and Heinz C. Schröder

AQ1

**Abstract** Multicellular organisms derived from one common ancestor the Urmetazoa. The only living fossils, which can testify about the earliest evolutionary processes in Metazoa on molecular level are the sponges (phylum: Porifera). The present study outlines that stem cells may play essential roles in cellular specialization, embryogenesis and sponge Bauplan formation, using the demosponge *Suberites domuncula* as a model. Data indicate that the archaeocytes represent, besides the germ/embryonic cells, totipotent stem cells. First marker genes have been identified which are expressed in totipotent stem cells and in cells from gemmules. Furthermore, genes have been described that are characteristic for the three main cell lineages in sponges; they all originated from archaeocytes and result in the differentiation of skeletal cells, epithelial cells and contractile cells. Finally it is shown that exposure to the endotoxin LPS (lipopolysaccharide) a differential gene expression occurs, leading to an upregulation of the gene encoding for perforin and a concomitant down-regulation of noggin, a stem cell marker. In parallel with this process an increased phosphorylation of the mitogen-activating protein kinase p38 occurs. This modification of the p38 kinase has been quantified with a novel ELISA assay. Our data suggest that in response to bacterial infection the number of stem cells in sponges decreases.

## 13.1 Introduction

Based on molecular biological and cell biological data it is now established that the approximately 30 phyla [including also the Porifera (sponges)], integrated in the multicellular animal kingdom of Metazoa, share one common ancestor the Urmetazoa (Müller et al. 1997; Müller 2001). Other than metazoan organisms, colonies of animal cells, such as choanoflagellates, display no division of labor.

---

W.E.G. Müller (✉)

Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie, Universität, Duesbergweg 6, D-55099 Mainz, Germany  
e-mail: wmueller@uni-mainz.de

In Metazoa the cells have been differentiated to perform a series of functions, like digestion, sensation, contraction or secretion (Grunz 2004). The determination of metazoan cells to a distinct fate occurs via an alteration in the pattern of gene activity/expression which thus allows a specification into distinct roles and functions. Specialized cells are the basis for pattern formation, a process during which a spatial and temporal pattern of cell activities is organized within the well-ordered organism (Nüsslein-Volhard and Wieschaus 1980). Metazoa are grouped into (i) the morphologically more diverse bilaterians, which themselves are further subdivided into Protostomia, including Ecdysozoa and Lophotrochozoa, and Deuterostomia and (ii) the non-bilaterian metazoans (phyla Porifera, Placozoa, Coelenterata and Ctenophora; Brusca and Brusca 1990).

During ontogeny a body plan is established which also defines the main axes of the multicellular animal. From Porifera to Arthropoda (Protostomia) and Vertebrata (Deuterostomia) the level of complexity of the axes (antero-posterior ends [oral-aboral polarity], dorsal-ventral sides) increases (Müller 2005). The two phyla Porifera and Coelenterata possess only two epithelial layers, the ecto-epithelium surrounding the body and the endo-epithelium (Bergquist 1978; Garrone 1978) which encloses the digestive cavity(ies); they are termed diploblastic animals. The two groups are defined by only one apical-basal polarity (Wiens et al. 2003). The triploblastic, bilaterian animals contain in addition to these external layers a third middle, mesodermal, cell layer which originates usually from the endoderm. Body pattern formation can be studied during embryogenesis or during differentiation of embryonic cells, e.g. in three dimensional cell cultures. These morphogenetic processes are based and controlled by differential spatial and temporal expressions of genes that initiate or maintain a large number of signaling pathways (Galliot and Miller 2000).

Segmentation (a process during which very similar functional units along a body axis are formed almost simultaneously [in insects]) or somite formation (sequential formation of units along a body axis [in vertebrates]) are features of triploblastic organisms. The formation of a body axis is controlled by characteristic sets of genes; e.g. in insects the parasegments are delimited by the function of the pair-rule genes and the subsequent segments by the segment polarity genes (Wolpert 1998). Ancestors of these genes exist in diploblasts, Coelenterata and Porifera as single molecules (Hoshiyama et al. 1998; Wiens et al. 2003).

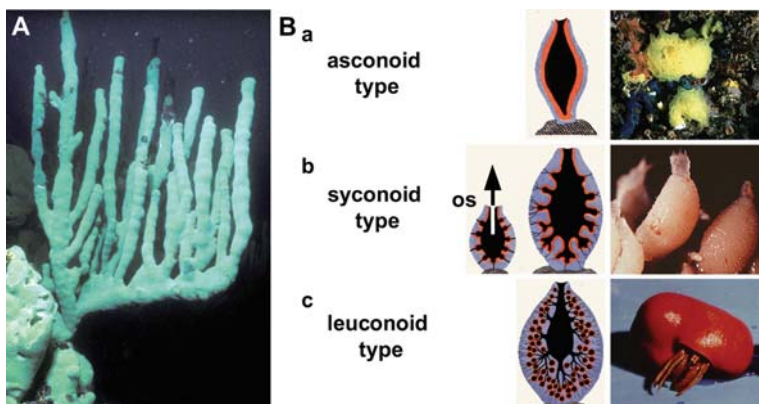
During the past few years it was elaborated that the Porifera (sponges), as the phylogenetically oldest metazoan phylum, possess already the basic structural and functional elements required for the construction of a body plan (Perovic et al. 2003). They evolved approximately 800 million years ago (Müller and Schäcke 1996). Sponges are grouped according to the inorganic composition of their skeleton (spicules) into the classes of Demospongiae and Hexactinellida, which possess hydrated, amorphous, noncrystalline silica spicules and the class of Calcarea, whose skeletal spicules are formed from calcium carbonate (Simpson 1984).

In sponges the water flow is directed from the lateral surface of the specimens, through the porocytes and the canals to the lacunae and the choanoderm [choanocyte

AQ2

AQ3

## 13 Stem Cell Pattern in Porifera



**Fig. 13.1** Body plan organization in the phylum Porifera. (A) Sponges, here *Lubomirskia baicalensis*, have the potency to conduct water from the external milieu through their inhalant openings at the surface to the exhalant apertures, the oscules. This highly complex aquiferous system is formed from differentiated somatic cells which interact in a tuned manner through cell-cell/cell-matrix interaction. The water flow through a specimen has been visualized with fluorescein; the pulsatory extrusion of the water current can be seen. (B) The three different organization/body plan patterns of sponges are shown. The choanoderm layer is in red and the pinacoderm layer in blue. (a) In the asconoid type, the sack-like organization shows an unfolded choanoderm. (b) In the syconoid type the folding of the choanoderm layer results in the formation of choanocyte chambers which are connected with the incurrent canals. After passing the chambers the excurrent canals lead the water current to the oscule (os). (c) The organization of the leuconoid type. This complex canal network is composed of discrete choanocyte chambers, connected with a network of incurrent and excurrent canals. In all three types of body organization a basal site (attachment to the substratum) and an oscular/apical pole (osculum; opening at which the central cavity which is connected with the excurrent canals extrudes the water) exists, which determines the axis (arrow). Representative species of the different organization levels are shown: (a) *Clathrina coriacea*, a calcareous sponge of the asconoid type. Magnification  $\times 0.2$ . (b) A syconoid type of organization as in *Sycon raphanus* (Calcarea);  $\times 3$ . (c) *Suberites domuncula* a siliceous sponge (Demospongiae) of the leuconoid type;  $\times 0.5$ .

This figure will be printed in b/w

chambers]; Fig. 13.1. These chambers are composed of two kinds of epithelial cell layers, formed by choanocytes [flagellated cells] and by cone cells [cells with a double-conical shape which hang into the chamber formed by choanocytes]. These layers surround the mesohyl; in this central body of the sponges, the cells are loosely embedded in a ground matrix, composed primarily of collagen, galectin and glyco-conjugates (Müller et al. 1997). This matrix surrounds motile archaeocytes, which are pluripotent, and other differentiated cells, e.g. the collencytes and lophocytes, that are involved in the formation of collagen as well as the sclerocytes that form the spicules. In addition, myocytes exist which allow contraction of the sponge body upon mechanical irritation (Simpson 1984).

According to the folding pattern of the two epithelial layers of the pinacoderm, in correlation to the choanoderm, three types of sponge complexity are distinguished;



the asconoid, the syconoid and the leuconoid type (Bergquist 1978). The folding of the choanoderm allows the formation of spherical chambers, the choanocyte chambers, of different structural degrees (Fig. 13.1). In the asconoid type, the lateral opening(s) direct the water current to the continuous layer of choanocytes which face a single atrium and then to the oscule (Fig. 13.1B-a). This organization is seen in some Calcarea, e.g. *Clathrina coriacea*. In the syconoid type the folding pattern forms choanocyte chambers and the water flow enters the sponge through the porocytes into choanocyte chambers through which the water is pressed into the atrium and finally via the oscule again to the external milieu (Fig. 13.1B-b). This type of organization is seen in Calcarea and Demospongiae; as an example the calcareous sponge *Sycon raphanus* is shown here. The leuconoid type derives from the syconoid type of organization (Fig. 13.1B-c). Here, the porocyte openings lead from the vestibule to the connecting incurrent canals and into the choanocyte chambers. Subsequently, the water current is pressed into excurrent canals which open into the atrium and then leaves the organism via the oscule (Fig. 13.1B-c). Most sponge species, like the marine (siliceous) demosponge *Suberites domuncula* (Fig. 13.1B-c) show the leuconoid type of organization. The Hexactinellida have an organization pattern which is reminiscent of the syconoid type and are composed of a choanoderm syncytium (see: Müller et al. 2004). Recently, the biochemical and molecular basis of the axis formation in sponge, here shown with the freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis* had been demonstrated (Fig. 13.1A; Wiens et al. 2006).

By molecular biological techniques – in the meantime more than 30,000 ESTs (<http://localhost/index.html>) have been elaborated from the sponge *S. domuncula* – and subsequent identification of the functions of sponge genes it could be disclosed that the basic strategies of body plan formation and of gene expression patterns found in Porifera are characteristic for Metazoa in general (Müller et al. 2001). Furthermore, an *in vitro* 3D-cell [three-dimensional] culture system, termed primmorphs, was established (Custodio et al. 1998; Müller et al. 1999a). Primmorph cultures is a newly developed technique to grow sponge cells *in vitro*; these cells have the potency to proliferate and to differentiate. This system allows an understanding of the roles of the morphogenetic and pattern forming genes. Amazingly the cell-cell- and cell-matrix adhesion molecules found in sponges share high sequence and functional similarity to those of higher metazoan phyla (Müller et al. 2004; Fig. 13.2). The extracellular binding sites to the ligands, but also the intracellular domains of these cell membrane receptors remained conserved throughout the animal kingdom. As also functionally proven, the receptors are provided with the properties of outside-in signaling (Wimmer et al. 1999b). This system allowed to study the effects of solute morphogenic factors (e.g. myotrophin; Schröder et al. 2000), or secreted molecules (e.g. epidermal growth factor; Perović-Ottstadt et al. 2004a), as well as of their receptors, that are involved in axis formation (Frizzled receptor; Adell et al. 2003b), and of transcription factors that are required for polarity formation (e.g. the organizer-specific factor *LIM homeobox protein*, Wiens et al. 2003; or Forkhead, Adell et al. 2003a) were discovered (Müller et al. 2004; Fig. 13.2).

## 13 Stem Cell Pattern in Porifera



**Fig. 13.2** Phylogenetic position of the Porifera within the metazoan kingdom. As first branches the three poriferan classes (Hexactinellida and Demospongiae emerged and finally the Calcarea) evolve from the common ancestor of all metazoan phyla, the Urmetazoa. The major evolutionary novelties which have to be attributed to the Urmetazoa are those molecules which mediate apoptosis, control morphogenesis, the immune molecules and cell adhesion molecules. The three classes of Porifera are the model systems which comprise a genetic reservoir of pattern formation characteristic for Metazoa; e.g. the transcription factors, like paired box homeodomain molecules, LIM-class homeodomain, T-box [Brachyury] or winged helix [Forkhead]. As a sister group to the Calcarea, the Cnidaria evolved. Subsequently, the Ctenophora emerged which comprise not only an oral/aboral polarity but also a biradial symmetry. In the Cnidaria the *paired box* transcription factors have been identified. Finally the Urbilateria developed from the Diploblasts (two epithelial layers), which are built from three germ layers (Triploblasts). They diverged into the Protostomia, with the crown species *D. melanogaster* and *C. elegans*, and the Deuterostomia with the humans. Within the triploblastic animals the homeobox genes are arranged in clusters

### 13.2 Basis of Metazoan Pattern Formation: The Stem Cell System in Sponges

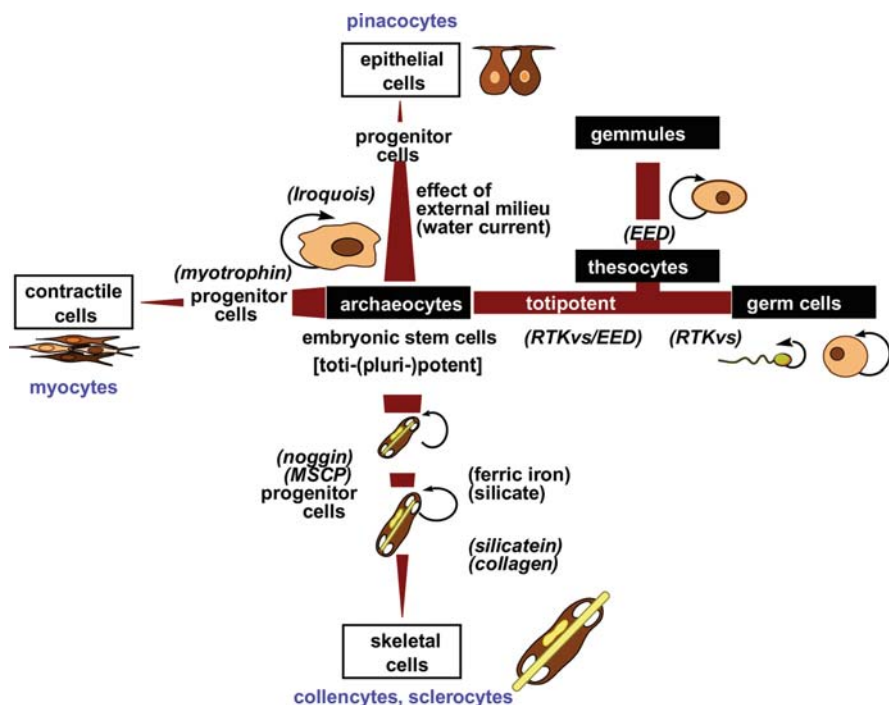
Multicellular animals are characterized by the existence of a series of differentiated somatic cells, in addition to the totipotent germ cells (Cory and Adams 1998). During evolution from the lowest metazoans, the sponges, to the crown taxa the

number of distinct cell types increased steadily (Müller et al. 2003a; Müller 2006). The different somatic cells types derive from the zygote through the respective stem cell stage; the differentiation proceeds in niches that form a microenvironment in which defined expression patterns of signaling molecules and local environmental factors direct the fate of the cells (Jones 2001). These niches modify their regulatory properties in response to a changing environment to ensure that stem cell activities meet the needs of an organism for a given differentiated cell type. Two major types of stem cells derive from the zygote, the germline stem cells and the somatic stem cells. While the germline stem cells retain their total differentiation capacity, this properties is restricted in the somatic stem cells which gradually lose their stem cell propensity. However, recent studies indicate that this traditional view of an irreversible loss of the stem cell ability during maturation of somatic cells might not completely reflect the physiological situation (Wagner and Weissman 2004). It appears that such fixed “points of no return” do not always exist but that at all levels of differentiation from the pluripotent progenitor cells to the committed progenitors to the lineage progenitors and finally the terminally differentiated cells, the propensity to act as stem cell is retained, even though with a decreasing intensity. In consequence, the differentiation lineages of somatic cells are dynamic and plastic and the strong distinction between embryonic stem cells and adult stem cells should be reconsidered.

It is generally agreed that the archaeocytes are the toti/pluri-potent cells in sponges from which the other cells originate; evidence was presented indicating a localization of archaeocytes not only within the mesohyl but also in the endopinacoderm layer (Borojevic 1966, 1970, 1971; Simpson 1984). Archaeocytes give rise to the major classes of differentiated somatic cells, (i) the epithelial cells, pinacocytes and choanocytes, (ii) the cells forming the skeleton, collencytes and sclerocytes, and (iii) the contractile cells, myocytes (Fig. 13.3). However, archaeocytes give not only rise to the different somatic cells but also to the germ cells from which the embryos originate (Diaz 1977 and 1979). Another line of differentiation of the archaeocytes is to the thesocytes, the totipotent cells of gemmules which are asexual propagative dissemination bodies. Pinacocytes, collencytes/sclerocytes and myocytes are cells with a low stem cell propensity, implying that these somatic cells are “terminally” differentiated (Simpson 1984).

At present, the study of embryonic stem cells in sponges is limited, since no technique to induce mass production of embryos under controlled conditions has yet been successful. As a substitution, the three-dimensional cell culture has been established for *S. domuncula* (Fig. 13.4A,E); Custodio et al. 1998; Müller et al. 1999a. Under suitable conditions dissociated, single cells (Fig. 13.4D) form special types of cell aggregates, the primmorphs (Fig. 13.4E). They contain cells of high proliferation and differentiation capacity. Furthermore, *S. domuncula* has the characteristics to propagate sexually [a free-floating egg is shown in Fig. 13.4B] and also asexually, via reproduction bodies termed gemmules (Fig. 13.4C).

### 13 Stem Cell Pattern in Porifera

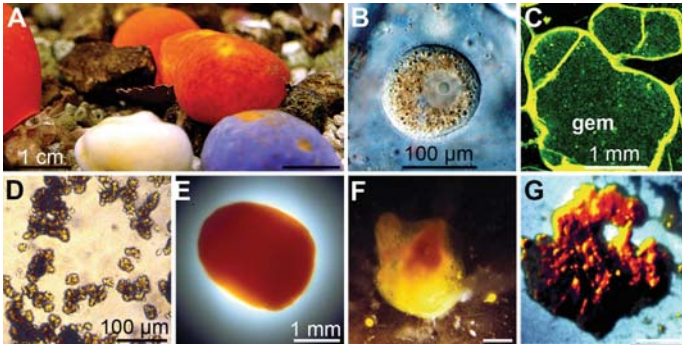


This figure will be printed in b/w

**Fig. 13.3** Sponge stem cell system. Schematic outline of the development of the toti-/pluripotent sponge embryonic stem cells, the archaeocytes, to the germ cells on one side and to the three major differentiated cell types, the epithelial-, the contractile- and the skeletal cells. It is indicated that during these transitions progenitor cells characteristic for these lineages have to be passed. The (potential) factors, e.g. noggin and the mesenchymal stem cell-like protein (MSCP) on the path to the skeletal cells, which trigger the differentiation are shown. In addition it is outlined that committed progenitor cells are formed which respond to the silicate/Fe(++) stimulus through differentiation to skeletal cells, the sclerocytes (=skeletal cells). Without losing the high level of stem cell propensity the archaeocytes change to germ cells and also to thesocytes, the dominant cells in gammules (sexual propagation bodies). The triangles schematically indicate the decrease in stem cell propensity during differentiation

#### 13.2.1 Marker Genes

In order to underline the view that the metazoan stem cell concept can also be applied to Porifera, characteristic marker genes have been cloned from *S. domuncula*. The first cDNA identified whose deduced protein shares sequence similarity to mammalian stem cell markers was the mesenchymal stem cell-like protein (MSCP). *MSCP* is present in mesenchymal human stem cells; experimental evidence exists that *MSCP* is expressed in osteogenic mesenchymal stem cells (Müller et al. 2003a). The functional studies revealed that in sponges the expression of this gene is under positive control of the morphogenetic inorganic elements silicon and ferric iron (Krasko et al. 2002; Müller et al. 2003b). In addition, two



**Fig. 13.4** The demosponge *S. domuncula*. It can be cultivated for over two years in aquaria (A). *S. domuncula* can propagate sexually (B- a free floating egg) and also asexually, via gemmules (C- a cross-section through gemmules [gem] which developed on a shell of the hermit crab on which the sponge lives). (D) Dissociated single cells from this species can form aggregates which differentiate to primmorphs (E) after an incubation period of more than 5 days. (F) A primmorph which developed on galectin-coated culture dishes; it shows canal-like structures. (G) A gemmule which had been treated with LPS, as described under “Materials and Methods”. Size bars for A–E are given; F,G: 1 mm

This  
figure  
will be  
printed  
in b/w

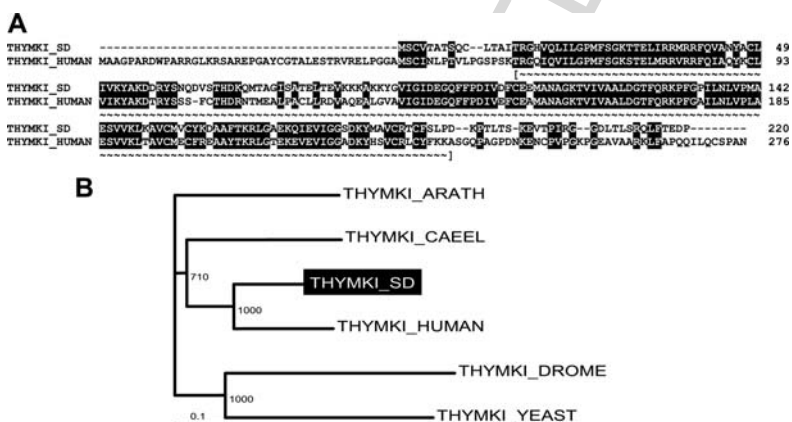
further potential genes, involved in the differentiation of stem cells in sponges, were isolated; noggin and the glia maturation factor (Schröder et al. 2003). Noggin is a glycoprotein that binds bone morphogenetic proteins selectively and antagonizes their effects. It was initially isolated from *Xenopus* and found to be expressed in the Spemann’s organizer. In vertebrate development noggin is involved in the formation of dorsal mesoderm derivatives, e.g. the skeletal muscles (Smith and Harland 1992; Smith et al. 1993; Valenzuela et al. 1995; Ogawa et al. 2002; Müller et al. 2003b).

In the initial phase of formation, the *in vitro* 3D-cell primmorph system contains predominantly the toti/pluri-potent archaeocytes which can be stimulated to differentiate into four main tissue-specific directions (Müller 2006). If they are induced by the inorganic factors silicate or ferric iron, the archaeocytes give rise to the skeletal cells though an increased expression of genes encoding the structural proteins silicatein and collagen; a process which is mediated by noggin and *MSCP* (Fig. 13.3); Müller et al. 2004. Second, if archaeocytes are exposed to a morphogen (myotrophin) they are directed towards the contractile cell lineage (Krasko et al. 2002; Müller 2006). A third lineage, which gives rise to the aquiferous canal system, is induced by a physical factor; there *Iroquois* gene expression is induced as a result of an increased water current which is paralleled with the formation of canal-like pores in the primmorphs (Perovic et al. 2003). In higher metazoans the expression of the *Iroquois* genes is thought to confer identity to a particular region, and hence it can be classified to the homeotic selector genes (see: Perovic et al. 2003). The early functions of *Iroquois* in insects include the definition of the eye and notum territories, and in vertebrates the formation of the neural ectoderm. Late functions of *Iroquois* are subdividing the territories; the dorsal-lateral subdivision in

### 13 Stem Cell Pattern in Porifera

*Drosophila* notum and the patterning of notum bristles and wing veins, and in vertebrates the subdivision of neural tube and heart patterning. The sponge *S. domuncula* not only contains in its genome an *Iroquois* gene, which comprises not only remarkable sequence similarity to those sequences described from triploblastic animals, but also expresses it during the formation of one major morphogenetic remodeling process, the construction of the aquiferous canal system (Fig. 13.3).

Two further genes have been cloned which are of relevance for the presented work here, the thymidine kinase and the perforin-like protein. In vertebrate cells, salvage pathway phosphorylation of thymidine is catalyzed by two thymidine kinases, the cell-cycle regulated cytoplasmic thymidine kinase-1 and the constitutively expressed mitochondrial thymidine kinase-2 (Segura-Pena et al. 2007). In cellular metabolism, thymidine kinase-1 and thymidine kinase-2 serve to maintain sufficient dTTP for DNA replication and repair. Hence the level of thymidine kinase-1 transcripts reflects the extent of cell proliferation of a given cell population. We have cloned from *S. domuncula* the cytosolic thymidine kinase-1 (Fig. 13.5), since it is a well known cell-cycle-regulated enzyme of importance in nucleotide



**Fig 13.5** Cytoplasmic thymidine kinase from *S. domuncula*. (A) The deduced sponge protein was aligned with the human soluble thymidine kinase 1 (THYMKI\_HUMAN; accession number NP\_003249.2; Segura-Pena et al. 2007). Amino acids, identical or similar among two sequences, are in inverted type. The border of the thymidine kinase (EC 2.7.1.21) [tdk] domain (hamap:MF\_00124; motif scan database [[http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)]) is marked [~~~~~]. (B) These two sequences were compared with the *C. elegans* thymidine kinase family member (thk-1) (THYMKI\_CAEL; NP\_501886.1), the *D. melanogaster* the putative protein CG40300-PC (THYMKI\_DROME; NP\_001036627.1), the *S. cerevisiae* suppressor of var1 protein (THYMKI\_YEAST; 151942764), and the putative thymidine kinase from *A. thaliana* (THYMKI\_ARATH; NP\_568426.1). After alignment the phylogenetic tree was built, using the plant sequence as an outgroup; the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) was used. The degree of support for internal branches was further assessed by bootstrapping (Felsenstein 1993). The numbers at the nodes are an indication of the level of confidence for the branches as determined by bootstrap analysis [1000 bootstrap replicates]

metabolism. The thymidine kinases-1 have a tetrameric structure in which each sub-unit contains an alpha/beta-domain that is similar to ATPase domains of members of the RecA structural family and a domain containing a structural zinc. The *S. domuncula* cDNA, encoding the thymidine kinase-1, was identified and was cloned as described (Perovic et al. 2003). The deduced protein with a chain length of 220 amino acids, giving a predicted size of 24,251 Da, shares highest sequence similarity to the human soluble thymidine kinase 1 (NP\_003249.2); Segura-Pena et al. 2007 (Fig. 13.5A). The two sequences share 45% identical amino acids and 56% similar amino acids. This high score is also reflected by the constructed rooted phylogenetic tree; the human and the sponge gene fall into one branch (Fig. 13.5B). Separated from this branch are the (distantly) related sequences from *Drosophila melanogaster* (3% identical – 7% similar amino acids) and *Saccharomyces cerevisiae* (31–44%). Again separated from these two branches is the thymidine kinase family member from *Caenorhabditis elegans*.

Since sponges are filter feeders that are exposed to large amounts of bacteria present in their surrounding aqueous milieu, they had to develop strategies to resist and defend themselves against attacking microorganisms, among them also the Gram-positive bacteria. In a previous study we could demonstrate that in primmorphs from *S. domuncula*, the expression of a gene, termed perforin-like protein [MARKER GENE FOR DEFENSE], is activated in response to exposure towards a Gram-negative  $\alpha$ -proteobacterium (Thakur et al. 2003). The perforin-like protein contains one EGF-like domain cysteine pattern signature and a C2 domain [thought to be involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid binding (Davletov and Suedhof 1993)].

### 13.2.2 Expression Pattern of Archaeocytes (Stem Cells): “Reproductive” Cells

Stem cells are self-renewing populations of cells that undergo symmetric and/or asymmetric divisions either to self-renew or to differentiate into different kinds of differentiated progeny. This minimal definition does not allow a clear distinction of stem cells from other dividing and differentiating cells (Cai et al. 2004). Surely, stem cells are provided with a high capacity for cell-cycle, for cellular protective and DNA repair mechanisms and for apoptosis. Recently genetic expression markers have been identified, which can be applied for the identification of “embryonic” cells and tissue in sponges (Müller 2007).

As outlined above, sponges have developed two propagation systems, sexual reproduction (Fig. 13.4B) and asexual reproduction by propagation bodies [gemmules] (Fig. 13.4C). The first study, using molecular markers to determine the restriction of gene expression during embryogenesis in a sponge appeared recently (Perović-Ottstadt et al. 2004b). It was found that in oocytes, morulae and blastulae/larvae from *S. domuncula* distinct genes are expressed, among them a sponge-specific receptor tyrosine kinase (RTKvs). In addition, the sex-determining protein FEM1 and the sperm associated antigen-related protein are highly expressed; in

## 13 Stem Cell Pattern in Porifera

adult animals the levels of expression of these genes are very low (Perović-Ottstadt et al. 2004b).

The asexual reproduction pattern in sponges, gemmule formation, was in focus already of early developmental biologists (Laurent 1842). Gemmule formation in sponges is induced by environmental factors, e.g. temperature, or dryness (Wagner et al. 1998). The cells in the gemmules are the thesocytes, which form a homogenous population (Fig. 13.3); it has been proposed that these cells also derive from the totipotent archaeocytes (see: Simpson 1984).

The recently identified MARKER GENES FOR TOTIPOTENT CELLS, which are highly expressed either in oocytes or in cells of gemmules, are the receptor tyrosine kinase *RTKvs* (oocytes and early larvae) and the embryonic development protein *EED* (gemmules); Müller 2006. The expression pattern of these genes are applied as tools to distinguish between differentiation levels of the cells. In tissue of adult *S. domuncula* those genes are expressed only in a few cells that are scattered in the pinacoderm. Sequence analyses of the two sponge RTKs shows that the extracellular part of the *S. domuncula* kinase RTKvs\_SUBDO has no obvious similarity to any other (deduced) protein hitherto submitted to the databases. Therefore, this part of the protein can currently be considered to be truly sponge-specific (Perović-Ottstadt et al. 2004b). The intracellular TK domain, however, possesses the 12 characteristic subdomains. The embryonic development protein EED of *S. domuncula* is a member of the Polycomb-group (PcG) family (Sewalt et al. 1998). *In situ* hybridization demonstrated that RTKvs\_SUBDO is highly expressed in eggs and early stages of embryos in *S. domuncula* (Müller 2006). In view of these data, we suggest that the cells expressing these two marker genes represent archaeocytes, which are in the “functional” state in either fertilized eggs or cells constituting early embryos (as for RTKvs\_SUBDO), or form the gemmules (EED2\_SUBDO); Fig. 13.6.

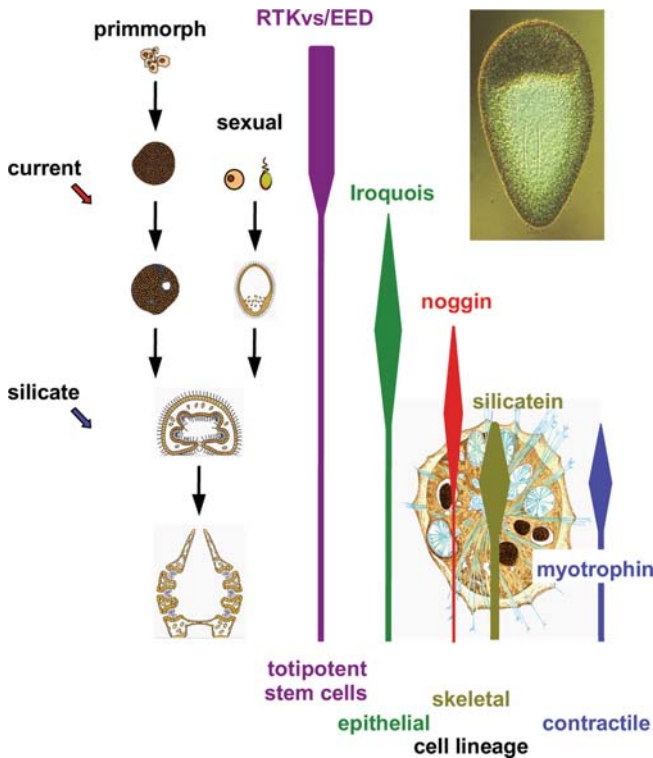
### 13.2.3 Expression Pattern of Archaeocytes (Stem Cells): Sclerocyte Lineage [Skeletal Cells]

Sclerocytes are the cells which produce the siliceous spicules, the skeletal elements of sponges. As outlined the mesenchymal stem cell-like protein (MSCP-I) and noggin can be considered as MARKER GENES FOR MULTIPOTENT STEM CELLS (Müller et al. 2003a). During differentiation to sclerocytes the genes *silicatein* and *collagen* undergo strong expression (Krasko et al. 2002).

### 13.2.4 Expression Pattern of Archaeocytes (Stem Cells): Pinacocyte Lineage [Epithelial Layer]

As reviewed, the pinacocyte surface layer can be looked upon as an epithelium (Müller et al. 2004). One MARKER GENE FOR THE DIFFERENTIATION





This figure will be printed in b/w

**Fig. 13.6** Sequential expression of (putative) stem cell marker genes in *S. domuncula*. In primmorphs as well as in germ cells a high expression of two genes can be identified, the sponge-specific receptor tyrosine kinase (RTKvs) and the embryonic development protein (EED). They might be considered as markers for totipotent stem cells. At exposure of primmorphs to a water current, the transcription factor Iroquois is expressed; this process is seen primarily in epithelial cells. Noggin as well as silicatein gene expression are provoked after addition of silicate/Fe(+++) to the culture medium; the expression is prominent in the skeletal (spicule)-forming cell lineage. In contractile cells (myocytes), myotrophin is expressed. As underlay of the bars, a photograph of a larva of the freshwater sponge *L. baicalensis* and a cross section through an entire sponge (*Craniella schmidtii*), showing embryos within the parent (Sollas et al. 1888), are given

of the archaeocyte stem cells to the pinacocytes has been isolated from *S. domuncula* (Perovic et al. 2003). This gene, *Iroquois* (MARKER GENE FOR THE PINACOCYTE LINEAGE) codes for a putative homeobox gene. The putative *Iroquois* transcription factor was found to be expressed in cells which are adjacent to the canal system; its expression is upregulated in primmorphs which are cultivated in strong water current (Perovic et al. 2003); Fig. 13.3. The finding that also in sponges the expression of the *Iroquois* gene is restricted to a specific tissue region, the epithelial layer of the aquiferous system, adds a further piece to the understanding of the complexity of tissue organization in sponges.

### 13.2.5 Expression Pattern of Archaeocytes (Stem Cells): Myocyte Lineage

Myocytes in sponges are functionally characterized as cells which synthesize the organic skeletal elements, e.g. collagen. During the progress of archaeocytes to myocytes, myotrophin is expressed in *S. domuncula* (Schröder et al. 2000). Myotrophin was first found in mammalian systems; in cardiac myocytes myotrophin stimulates protein biosynthesis (Sen et al. 1990), suggesting a crucial role in the formation of cardiac hypertrophy (reviewed in: Sil et al. 1998; Schröder et al. 2000). The sponge myotrophin shares the highest sequence similarity with the human molecule. Recombinant sponge myotrophin was found to stimulate protein synthesis by 5-fold (Schröder et al. 2000). Since myotrophin is neither expressed during embryogenesis nor in gemmules, it might be characterized as a MARKER GENE FOR THE MYOCYTE LINEAGE. After incubation of single cells with myotrophin the primmorphs show an unusual elongated, oval appearance. Furthermore, in the presence of myotrophin sponge cells up-regulate collagen gene expression. We assume that the sponge myotrophin causes in homologous cells the same/similar effect as the cardiac myotrophin in mammalian cells, where it is also involved in initiation of cardiac ventricular hypertrophy.

## 13.3 Bacterial Infection

Sponge-bacteria interactions are probably among the oldest host-bacteria interactions known dating back more than 500 million years in time (Wilkinson et al. 1984). Several studies have revealed that permanent associations exist between certain host sponges and specific microorganisms, however their interactions remained largely unknown (Althoff et al. 1998; Friedrich et al. 1999; Schmidt et al. 2000). Moreover, sponges may also succumb to microbial and fungal infections which result in the disintegration of the sponge fibers/tissue and ultimately lead to sponge death (Vacelet et al. 1994). The fact that sponges are susceptible to microbial infection suggests that they should also be provided with mechanisms to prevent these types of diseases.

It is known that sponges possess molecules resembling those of the mammalian immune system (Müller et al. 1999b). As examples of the innate immune system, scavenger receptor cysteine rich domains and macrophage derived cytokine-like molecules have been identified which are upregulated during auto- and allografting experiments. In addition, the (2'-5') oligoadenylate synthetase system exists in sponges (Schröder et al. 2008). Precursors of the adaptive immune system have also been identified and were shown to be functional in sponges (Müller et al. 2004). Accordingly, the expression of a lymphocyte-derived cytokine from mammals is up-regulated during non-self experiments in *S. domuncula*. In the sponge *Geodia cydonium*, two immunoglobulin like receptors have been

identified which are also up-regulated during grafting experiments. These findings demonstrate that sponges contain elements for innate immune recognition (Müller et al. 1999b).

The lipopolysaccharide (LPS)-mediated pathway is an additional mechanism involved in the mammalian immune response. LPS, an endotoxin derived from the outer cell wall of Gram-negative bacteria binds to the cell surface molecule CD14 (Ulevitch and Tobias 1994). This interaction is mediated by LPS-binding protein(s) (Scott et al. 2000). CD14, a plasma membrane linked molecule presents LPS to a specific transducer resulting in an enhanced production of reactive oxygen metabolites and gene expression (reviewed in: Jiang et al. 2000). Serine-threonine directed MAP (mitogen-activating protein) kinases are essential components of the LPS-mediated pathway. These proteins can be grouped into three main families, the extracellular signal-regulated kinases (ERKs), the p38 kinases and the c-jun N-terminal kinases (JNKs) (Seger and Krebs 1995). In deuterostomes, the latter two kinases are phosphorylated after exposure of cells to LPS (Yang et al. 2000). In view of the recent findings by Müller et al. (1999c) it is hypothesized, that a similar LPS-mediated immune response pathway can also be found in sponges.

In a previous study we demonstrated (Böhm et al. 2001), that cells from *S. domuncula*, exposed to LPS, respond with the activation [phosphorylation] of the stress-activated MAP kinases p38 and JNK. Furthermore first insights into the types of microorganisms that are permanently associated with *S. domuncula* were gathered. In addition, we obtained evidence that in sponges LPS interacts with Gram-negative bacteria via a cell-surface bound receptor, the LPS-binding protein (Wiens et al. 2005). The cDNA was isolated and the protein expressed. During binding to LPS the protein dimerizes. Co-immunoprecipitation analysis revealed that this protein interacts with MyD88, after exposure of the animals towards LPS. The sponge MyD88 is composed of two protein interaction domains, a TIR domain (present in Toll-like receptors and in MyD88) and a death domain (present in MyD88 and IRAK). Northern blot experiments and *in situ* hybridization studies showed that the level of the LPS-binding protein does not change after LPS treatment, while MyD88 is strongly upregulated. As an executing molecule of this pathway (LPS-binding protein – MyD88) the macrophage expressed protein, a perforin-like molecule (Mr 74171), was identified. The cDNA was isolated; the gene is highly expressed after LPS treatment, especially at the surfaces of the animals. The recombinant protein comprises biological activity and eliminates Gram-negative bacteria (*E. coli* and BL21 [sponge-associated Gram-negative bacteria] were used); it is inactive against the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. These data indicate that *S. domuncula* is provided with an innate immune system against Gram-negative bacteria; the ligand LPS (a pathogen-associated molecular pattern) is recognized by the pattern-recognition receptor (LPS-binding protein) which interacts with MyD88. A signal transduction is established which results in an elevated expression of both MyD88 and the macrophage expressed protein, as executing proteins.

### 13.3.1 Activation of p38 Kinase

The phosphorylation of the two enzymes (p38 kinase and JNK protein kinase) strongly increases after exposure of the sponge tissue to LPS, a response which is characteristic of the mammalian p38 kinase and the JNK protein kinase activation in response to LPS. The activation occurs rapidly within the first hour after LPS exposure. Moreover, the inhibitory effect of LPS on cells from *S. domuncula* has also been determined by measuring the incorporation of tritium labeled phenylalanine into protein fraction. At a concentration of 3  $\mu\text{g/ml}$  of LPS, the reduction in the incorporation rate is already significant (Böhm et al. 2001). These findings show that the defense pathways are highly conserved between sponges and humans (Böhm et al. 2002).

### 13.3.2 ELISA Assay (Method)

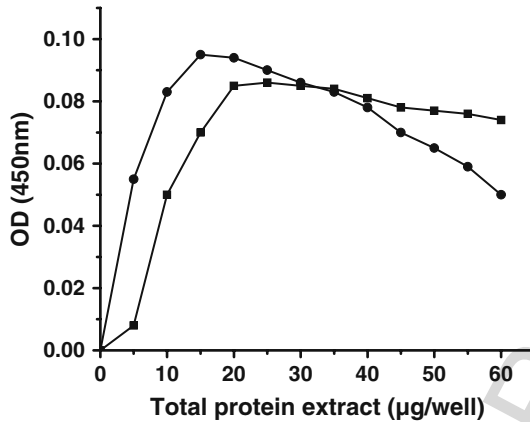
#### 13.3.2.1 Preparation of Sponge Total Protein Extract

Primmorphs are exposed to LPS 10  $\mu\text{g/ml}$  (L2880, Sigma, Deisenhofen, Germany) and then processed as described (Böhm et al. 2000). Tissue is extracted with lysis-buffer ( $1 \times$  TBS [Tris-buffered saline], pH 7.5, 1 mM EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid], 1% Nonidet-P40, 10 mM NaF, protease inhibitor cocktail [1 tablet/10 ml] and 1 mM sodium orthovanadate) after homogenization in a mortar; the clear supernatant is obtained by centrifugation ( $13,000 \times g$ ; 10 min;  $4^\circ\text{C}$ ) and then subjected to ELISA analysis.

#### 13.3.2.2 Determination of the Phosphorylation Level of p38 by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of the phosphorylation level of p38 was developed. This ELISA assay is based on the ability of the anti-phosphorylated 38 (pp38) antibody to bind with high affinity to a peptid containing the TGY recognition motif (Böhm et al. 2000). The total protein extract is covalently bound to a 96-wells polystyrene plate. The complexes formed between proteins bound to the plate and the antibodies against pp38 are detected using a peroxidase-conjugated secondary antibody and the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as substrate.

In detail: Flat-bottomed polystyrene 96-well Pro-Bind plates (Becton Dickinson, France) were covered with 50  $\mu\text{l}$  of total protein extract in final concentrations of 5–60  $\mu\text{g/well}$  during incubation for 3 h at room temperature. After washing three times with phosphate buffered saline (PBS), containing 0.05% Tween-20 (PBS/T buffer), the plates were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS (150  $\mu\text{l/well}$ ), overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The level of pp38 in the protein mixture bound to the plate was detected with a polyclonal antibody against phosphorylated p38 (pp38) from



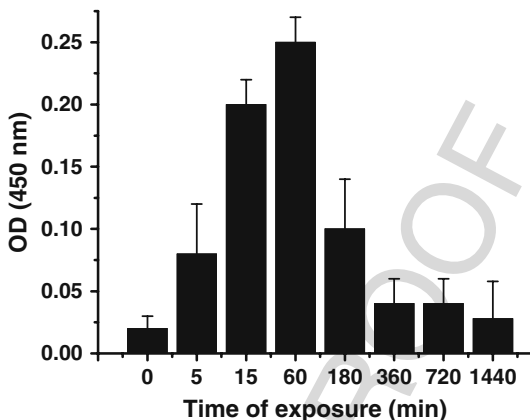
**Fig. 13.7** ELISA test for the determination of the level of pp38 in sponge tissue extracts. For this series of experiments extracts from primmorphs had been used. ELISA plates were coated with 5–60 µg/well of sponge protein extract. Subsequently, the level of pp38 in the extract was detected with the commercial polyclonal antibodies against phosphorylated p38 (pp38) from Santa Cruz Biotechnology (■) and the home-made anti-pp38 antibodies against the *S. domuncula* peptide (●) (Müller et al. 2002). Immunocomplexes were obtained by addition of a goat anti-rabbit IgG, which had been conjugated with horseradish peroxidase and visualized with the TMB substrate. Photometric determination was performed at 450 nm

*S. domuncula* (Müller et al. 2002); this antibody was diluted 1:1000. In addition, also a second commercial polyclonal antibody which was raised against pp38 was used (Santa Cruz Biotechnology, California) and applied at a dilution 1:2000. Again, the antibodies were diluted in PBS/BSA and incubated for 1 h. After blocking with 2% goat serum (Dianova, Hamburg, Germany) and 0.3% BSA in PBS for 30 min, the immunocomplexes were detected using goat anti-rabbit IgG, conjugated with horseradish peroxidase (1:10000; Sigma, Deisenhofen, Germany) under application of the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine [TMB] substrate (KPL, Germany). The reaction was stopped after an appropriate time (typically 10 min) by adding 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; the absorbance (OD<sub>450</sub>) was measured at 450 nm (Titertek MultiScan Plus).

This direct ELISA assay was used to determine the p38 activation [phosphorylation] level in sponge primmorphs exposed to LPS. At first, the optimal concentration of the extract which reveals the highest signal in the photometric test was titrated. There sponge protein extract was added to the wells in concentrations between 5 and 60 µg/well of sponge protein extract (Fig. 13.7). The results revealed that at a concentration between 10 and 20 µg/well the highest OD<sub>450</sub> can be recorded. Interestingly, the two antibodies used for this series of experiments, the commercial anti-pp38 (Santa Cruz Biotechnology, California) and our anti-pp38 raised against the *S. domuncula* peptide gave the same results.

Subsequently, this ELISA assay was applied to determine in a time-kinetic experiment the time required for the sponges to react to LPS. Primmorphs were exposed to 10 µg/ml of LPS for 5 min to 24 h. Then protein was prepared and subjected to

**Fig. 13.8** Effect of LPS exposure on activation of pp38 in *S. domuncula* primmorphs. The tissue-like 3D-cell culture had been incubated for 5 min to 1440 min (24 h) with 10  $\mu$ g/ml of LPS. Then protein was extracted and a 20  $\mu$ g/well were coated onto the wells and incubated with anti-pp38 (Santa Cruz Biotechnology). The background values, measured with p38 antibodies, were subtracted



the ELISA assay to quantify the level of pp38. The highest level of phosphorylation of p38 (to pp38) was measured after 60 min (Fig. 13.8).

From these data we conclude (i) firstly that primmorphs from *S. domuncula* respond – also under the experimental conditions used – to the exposure to LPS and (ii) secondly that the highest level of phosphorylation (formation of pp38) is seen after an exposure time of 60 min.

### 13.3.3 Real-Time Reverse Transcription-PCR (Method)

The technique of real-time reverse transcription-PCR (RT-qPCR) was used to quantify the expression levels of the genes coding for; (i) STEM CELL NUMBER: noggin (noggin-1 [*S. domuncula*] NOGG-1\_SD; accession number CAD59735; Müller et al. 2003b); (ii) PROLIFERATION: thymidine kinase (THYMKI\_SD [*S. domuncula*]; accession number AM905441), (iii) DIFFERENTIATION: integrin- $\beta$  (integrin beta subunit [*S. domuncula*] INTb\_SD; CAB38100; Wimmer et al. 1999a,b), and (iv) LPS-INFECTION: perforin (macrophage expressed protein [*S. domuncula*] MPEG\_SD; AJ890501; Wiens et al. 2005) and finally (v) THE HOUSEKEEPING GENE: glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH\_SD [*S. domuncula*]; accession number AM902265).

#### 13.3.3.1 Total RNA Extraction

Samples were extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from primmorphs was isolated by the modified guanidine hydrochloride method (Yoshikawa et al. 2000). The concentration of each RNA sample was measured using a spectrophotometer. Only the RNA samples with a 260/280 ratio between 1.8 and 2.2 and a 260/230 ratio

higher than 1.9 were used for the analysis. In addition the integrity of RNA samples was assessed by agarose gel electrophoresis.

One microgram of each mRNA was reversely transcribed using the oligo dT primer and Super Script II (Invitrogen) as described (Yoshikawa et al. 2000).

### 13.3.3.2 Primer Design

For GAPDH expression studies the following primer pair had been selected: the upper (forward) primer was 5-ATCACAGGGGGAGCAAAGAA GGTCAT-3 [26mer] and the lower (reverse) primer 5-AAGTGGGGCTAGGC AGTTTGTGGTG-3 [25mer]; for *noggin* expression upper 5-TTCCCTCG ATATTTTCTGCTGGCTCTT-3 [28mer] and lower 5-CGTCCTTCCTCTTC GTCTCTTACTATTG-3 [29mer]; for *integrin-β* expression upper 5-CTTTGGACCTGCTTGCGAGTGTGA-3 [24mer] and lower TCGCAA GCCGTTCCAAAGTAAGGTT-3 [25mer]; for *thymidine kinase* expression upper 5-CTTTCCCGATATTGTAGACTTTTG-3 [24mer] and lower 5-CACACCATACAGACTGCCTTTAG-3 [23mer] and for *perforin* expression upper 5-CAATGAGATGTCCGGGTGGGTTTACT-3 [26mer] and lower 5-GTTCTTTCGCAGGGTGGGCTTAGG-3 [24mer]. The PCR product lengths had been: *GAPDH* fragment 150 bp [ranging from: 399-424 to 548-524]; *noggin* fragment 183 bp [422-449 to 604-576]; *integrin-β* fragment 147 bp [1398-1421 to 1544-1520]; *thymidine kinase* fragment 165 bp [327-350 to 491-469] and *perforin* fragment 155 bp [1895-1920 to 2049-2026].

### 13.3.3.3 qPCR

RT-qPCR was done using the Light Cycler (Roche Diagnostics, Meylan, France), which exploited the ability of SYBR green to fluoresce after hybridization with a double-strand DNA. The analyses were performed in 20 AL glass capillaries using the Light Cycler fast start DNA master SYBR green kit (Roche Diagnostics). Then, 1 mM of each primer and 3 mM of MgCl<sub>2</sub> in the total volume of 20 μl were used in each real-time RT-PCR amplification. The real-time RT-PCR cycle started with the initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 57.3°C for 10 s for *GAPDH*, 56.1°C for 10 s for *noggin*, 56.7°C for 10 s for *integrin-β*, 53.0°C for 10 s for *thymidine kinase*, and 56.8°C for 10 s for *perforin* and finally an elongation at 72°C for 10 s. As an internal quantitative control of the gene expression, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene expression was determined.

## 13.4 Assessment of the Stem Cell Level in Primmorphs

As known from earlier studies primmorphs contain proliferating and differentiating cells (Custodio et al. 1998; Müller et al. 1999a). If these 3D-cell aggregates remain under slight rotation, they do not attach to the substratum (petri dish). However, if

## 13 Stem Cell Pattern in Porifera

they are placed onto coated plastic dishes (Wiens et al. 2003; Adell et al. 2007) they adhere and start to reconstitute to organ-like assemblies, expressing e.g. genes encoding proteins of the Wnt pathway.

### 13.4.1 Primmorph Formation

Primmorphs were obtained from single cells as described before (Custodio et al. 1998; Müller et al. 1999a); they reached sizes of 3–5 mm after three days. During this period the cultures were slightly shaken. Then, the primmorphs were transferred into a culture dish and cultivated further in natural seawater, supplemented with 0.2% of RPMI1640 – medium and the optimal silicate concentration (60  $\mu$ M; Wiens et al. 2004). Incubation of the cultures continued for 1 to 3 days as follows; the primmorphs (i) remained under shaking in this medium in non-coated dishes, or (ii) were transferred into plates coated with recombinant *S. domuncula* galectin (Wiens et al. 2003). Primmorphs kept under such conditions strongly increased the proliferation and differentiation capacity of their cells. Among the genes which underwent high expression were the homeobox genes (Wiens et al. 2003). In the final series of experiments, the primmorphs (iii) were transferred to galectin-coated plates and incubated for 3 to 5 consecutive days with 10  $\mu$ g/ml of LPS (Sigma L2880; LPS from *E. coli*). Representative images are shown in Fig. 13.4. Those primmorphs which remained under shaking for 3 days remained as ball-like aggregates in the medium, and did not attach to the substrate (Fig. 13.4E). Those primmorphs which could attach to the petri dish on the galectin coat, formed canal-like structures (Fig. 13.4F); and finally the primmorphs which had been incubated for 3 days in the presence of LPS developed the “apoptotic” bud (Fig. 13.4G).

### 13.4.2 Expression Pattern in Primmorphs for Noggin, Thymidine Kinase, Integrin and Perforin in Dependence on Adhesion and LPS Treatment

The primmorphs remained either untreated (formation of ball-like, non-adherend 3D-cell aggregates; Fig. 13.4E), or were placed onto galectin-coated culture dishes (attached primmorphs, which show canal-like structures Fig. 13.4F), or were treated with LPS (primmorphs which show “apoptotic” structures; Fig. 13.4G). Since the effect of the different treatment on gene expression should be measured, the duration of treatments was set to 1 and 3 days, respectively. After this incubation period the primmorphs were collected, the RNA extracted, mRNA purified and finally analyzed by RT-qPCR for the transcript levels. In Table 13.1, the relative expression levels for the different marker genes (*noggin*, *thymidine kinase*, *integrin- $\beta$* , and *perforin*) are summarized.



**Table 13.1** Relative quantification of *noggin*, thymidine kinase, integrin- $\beta$ , and perforin in primmorphs under different treatment. The 3D-cell aggregates remained either non-attached (non-treated [culture dishes on a moving platform]), or cultured on galectin-coated dishes (attachment of the primmorphs and formation of canal-like structures), or were treated with LPS (formation of “apoptotic bodies”). The relative expression of reference genes in primmorphs are given. Assays of transcript levels for each reference gene were normalized by use of the housekeeping gene *GAPDH*. Each experiment has been performed 5-times; the means and the standard deviations are given

Primmorphs Treatment:	Duration (days)		qPCR ratio [ratios $\times$ 100]			
	1	3	Noggin: GAPDH	TK: GAPDH	Integrin- $\beta$ : GAPDH	Perforin: GAPDH
None	1		0.025 $\pm$ 0.003 [2.5-]	0.051 $\pm$ 0.006 [5.1-]	0.028 $\pm$ 0.004 [1.8-]	0.001 $\pm$ 0.001 [0.1-]
		3	0.031 $\pm$ 0.004 [3.1-]	0.047 $\pm$ 0.005 [4.7-]	0.024 $\pm$ 0.003 [2.4-]	0.003 $\pm$ 0.001 [0.3-]
Galectin-coated dishes	1		0.019 $\pm$ 0.004 [1.9-]	0.041 $\pm$ 0.005 [4.1-]	0.068 $\pm$ 0.007 [6.8-]	0.002 $\pm$ 0.001 [0.2-]
		3	0.017 $\pm$ 0.004 [1.7-]	0.039 $\pm$ 0.005 [3.9-]	0.072 $\pm$ 0.008 [7.2-]	0.0017 $\pm$ 0.002 [0.2-]
LPS	1		0.003 $\pm$ 0.001 [0.3-]	0.0089 $\pm$ 0.001 [0.1-]	0.0044 $\pm$ 0.005 [0.4-]	0.056 $\pm$ 0.007 [5.6-]
		3	0.007 $\pm$ 0.001 [0.7-]	0.001 $\pm$ 0.001 [0.1-]	0.0063 $\pm$ 0.007 [0.6-]	0.089 $\pm$ 0.010 [8.9-]

#### 13.4.2.1 Expression in Non-treated Primmorphs

The highest expression level of the reference gene in primmorphs which remained in the rotating culture dishes was seen for *noggin*; with a ratio to *GAPDH* of 0.025 [2.5-fold ( $\times 100$ ) expression with respect to *GAPDH*; 1 day incubation period] (Table 13.1). This value increased to 3.1-fold after 3 days. Comparably high is – in these primmorphs – also the expression level of the *thymidine kinase*; a 5.1-fold ratio has been measured at day 1, and a 4.7-fold at day 3. A lower level had been determined for *integrin- $\beta$*  with 1.8- and 2.4-fold (day 1 and day 3, respectively). Very low is the transcript level of *perforin*; it measures at day 1 0.1-fold and at day 3 0.3-fold.

#### 13.4.2.2 Expression Levels in Attached Primmorphs

As expected, the relative level of *integrin- $\beta$*  expression is highest with 6.8-fold (day 1) and 7.2-fold (day 3); Table 13.1. comparable with the ratios in the non-attached primmorphs are the values for *thymidine kinase* with 4.1-fold (day 1) and 3.9-fold (day 3); lower is the ratio for *noggin* with 1.9-fold (day 1) and 1.7-fold (day 3). Unchanged remained the expression ration for *perforin* with 0.2-fold.

#### 13.4.2.3 Level of Expression in LPS-Treated Primmorphs

A drastic effect on the expression level is seen if the primmorphs are incubated with LPS (Table 13.1). The ratios of expression for *noggin*, *thymidine kinase* and

## 13 Stem Cell Pattern in Porifera

*integrin- $\beta$*  drop to very low levels, with 0.3-fold (*noggin*), 0.01-fold (*thymidine kinase*) and 0.4 (*integrin- $\beta$* ). In contrast, the level for perforin expression strongly increases to 5.6-fold (day 1) and 8.9-fold (day 3) in LPS treated primmorphs.

### 13.5 Effect of LPS Treatment on the Number of Stem Cells

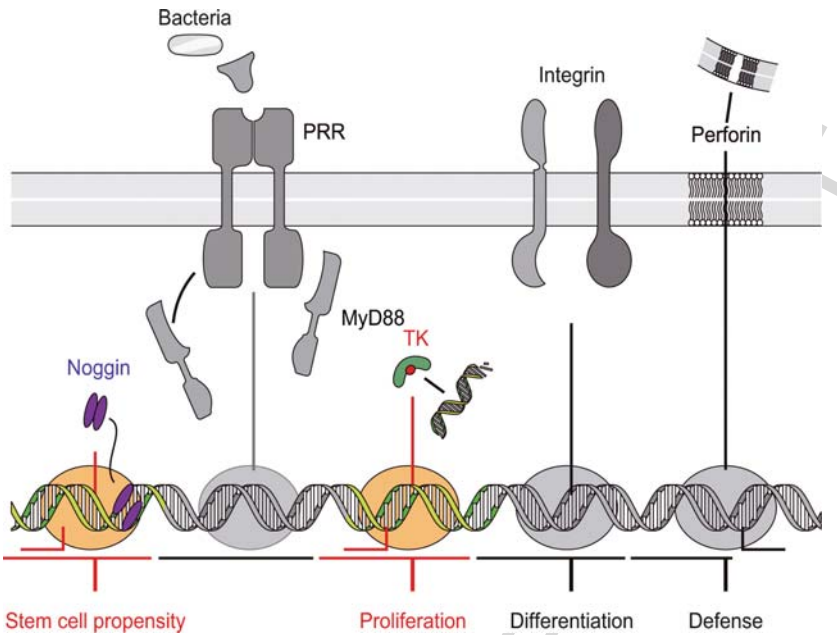
Exposure of mouse embryo stem cells to LPS results in a Fas-mediated apoptosis (Zou et al. 2000). On the other hand, it had been reported that LPS causes an induction of mesenchymal stem cells towards an osteogenic differentiation (Cho et al. 2006). Therefore, it was suggestive to study the effect of the endotoxin LPS on the number of stem cells in the primmorph system.

In order to provide the basis for conclusive results, the number of stem cells in non-differentiated (ball-like non-attached primmorphs) and substrate-caused differentiating primmorphs (attached aggregates) had to be assessed first. To estimate the number of stem cells, the level of expression of *noggin* (marker for toti/omnipotent cells) had been quantified by qPCR. In parallel, the transcript level of *thymidine kinase* (marker for proliferation), *integrin- $\beta$*  (marker for substrate adhesion) and *perforin* (marker for the executing anti-bacterial protein) had been determined.

In the absence of any additional extracellular effector/mediator the ball-like primmorphs show a high level of expression of *noggin* and *thymidine kinase* genes (Table 13.1) This result confirmed earlier observations that cells in these aggregates show a high proliferation capacity – and no apparent sign of formation of tissue-like assemblies (Custodio et al. 1998; Müller et al. 1999a). A schematic representation is given in Fig. 13.9.

The primmorphs which had been attached to the substrate, the galectin-coated culture dishes, show a high expression of the gene encoding *integrin*, and considerable levels of *thymidine kinase* and *noggin* transcript (Table 13.1), while the expression of *perforin* is low (Fig. 13.10).

Based on the recent observation, suggesting that the signal transduction pathway, originating from pattern-recognition receptors activates also the MAP-kinase system (Lee and Kim 2007; Beisswenger et al. 2007), we asked if LPS exposure results in a differential alteration in gene expression in primmorphs. Indeed it was determined that the expression level of the defense molecule against microorganisms, *perforin*, strongly increases from 0.1-fold (untreated primmorphs) to 5.6-fold (LPS-exposed primmorphs); Table 13.1. This upregulation is selective, since simultaneously the expression level of *noggin*, *thymidine kinase* and the *integrin* gene undergo a drastic reduction (Fig. 13.11). It remains to be studied if this effect is reversible. Considering these data – positive impact of anti-bacterial proteins on gene expression under simultaneous down-regulation of expression of those genes which regulate differentiation plasticity and cell differentiation – support the view that the LPS caused-effect on cell metabolism results also in an induction of apoptotic signaling pathways.



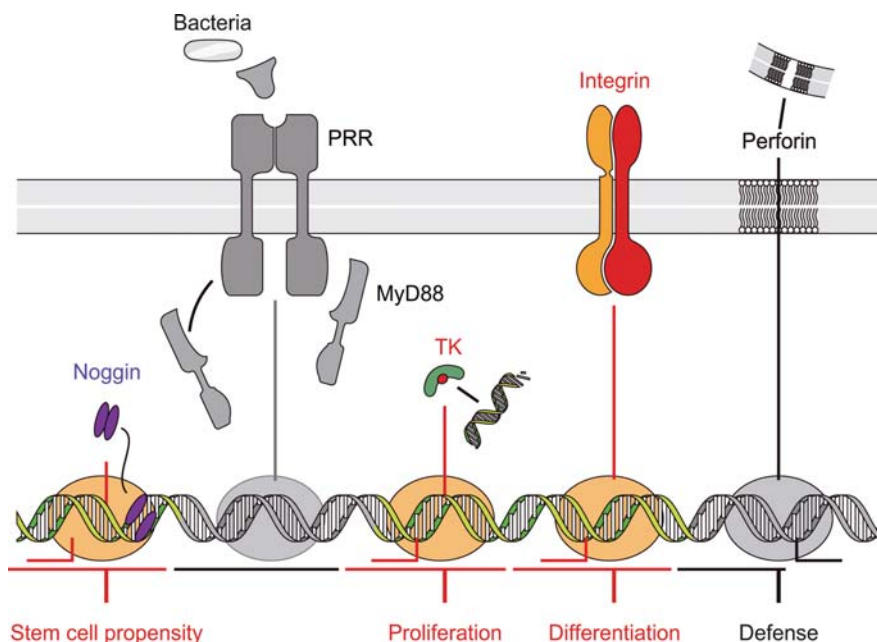
This figure will be printed in b/w

**Fig. 13.9** Schematic outline of the signal-transduction pathways and of the gene expression levels in primmorphs which remained in a non-attached state in the culture dish. In these aggregate the cell-surface associated receptors, pattern-recognition receptor (PRR) and the integrins, are (if at all) only insignificantly expressed. Consequently, the expression of the underlying genes, *pattern-recognition receptor* and *integrin*, are not expressed. Likewise the gene encoding the executing extracellular attacking protein, perforin, is not expressed. In contrast, the transcript level of *noggin* (an indicator for the number of stem cells) and *thymidine kinase* is high, indicating the high level of cells, provided with high differentiation plasticity and proliferation capacity

## 13.6 Concluding Remarks

There was never a faster progress in the understanding of the differentiation capacity of sponge cells than during the last 10 years when the power of molecular biology was developed and applied. It became possible to trace back empirical observations on a causal-analytical basis. Already over 100 years ago the astonishing regeneration power of sponge cells (Schmidt 1862), and of the archaeocytes in particular (Wilson 1907), had been recognized. The concept of embryonic unspecialized cells in hexactinellids had been introduced by Schulze (1904) who coined them “sorites”. These sorites were described as separate cell types besides the germ cells. The processes of spermatogenesis as well oogenesis and also of embryogenesis of Demospongiae had been described in detail by Noll (1888). Interesting – but at the time not recognized – are the contributions of Diaz (1979) on the transformation of cells in sponges through differentiation and de-differentiation. Especially his view on the plastic differentiation capacity between archaeocytes and epithelial cells is here relevant. After the identification of the first protein-coding genes in *G. cydonium* and

### 13 Stem Cell Pattern in Porifera

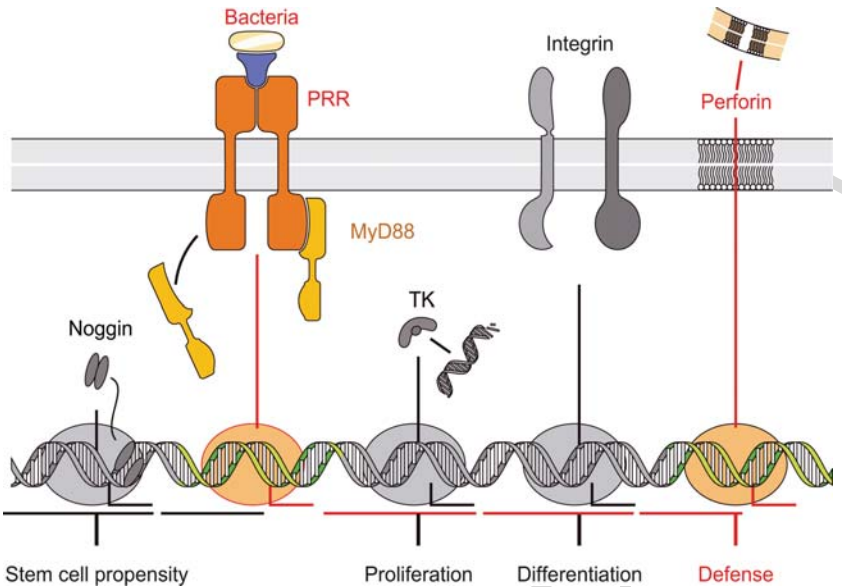


**Fig. 13.10** Expression level in primmorphs which had been attached to galectin-coated petri dishes. The level of *integrin* transcript level is high, also the level for *noggin* and *thymidine kinase* is substantial. Again, the transcripts encoding the toxic protein perforin is low

*S. domuncula* it became suddenly overt that the sequences of the sponge genes are characteristically metazoan-like and share high sequence similarity to those found in humans (Pfeifer et al. 1993). In addition, the *in vitro* primmorph cell culture system became a powerful tool to study gene expression in “embryonic” cells.

Focusing on the stem cell system in sponges the main lessons are; (i) their cells progress from a primordial stage to terminally differentiated stages, (ii) they contain totipotent stem cells, (iii) during the progression from stem cells to differentiated cells genes are expressed among which some share high sequence similarity to those identified in vertebrates. At present it is the notion that the plasticity of stem cells is high, because of the high regeneration/repair capacity of somatic sponge cells. Molecular genetic studies in sponges will continue to be at the forefront to clarify also this view. After all, it is expected that ultimately sponges might become the model for the understanding of the metazoan stem cell system, in a similar rank as they have taken in the fields of the early evolution of Metazoa, of the origin of metazoan immune system and of the metazoan Bauplan (Pilcher 2005). Finally it could be demonstrated that an exposure of primmorphs to LPS causes a reduction of the number of stem cells under simultaneous upregulation of the defense molecule perforin.

**Note:** The following sequences from *Suberites domuncula* have been deposited (EMBL/GenBank): the cDNA for the glycerol 3-phosphate dehydrogenase



This figure will be printed in b/w

**Fig. 13.11** Innate immune response in sponges against Gram-negative bacteria. The simplified model of the LPS-mediated signaling shows that LPS, a pathogen-associated molecular pattern (PAMP), causes (homo)dimerization of the LPS-binding protein, a pattern-recognition receptor (PRR), on the cell surface. After complex formation between PAMP and PRR, PRR initiates a signal transduction cascade, with MyD88 as the first member. Downstream, intermediate members of the signaling pathway, which likely involves IRAKs, TRAFs, NF- $\kappa$ B and also LITAF (to be published), transduce an increased expression of the activation phase's key molecules, PRR and MyD88, and finally of the executing effector/defense molecule, the perforin-like protein

(GAPDH\_SD) under AM902265 and for thymidine kinase (THYMKI\_SD) under AM905441.

**Acknowledgments** This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (WI 2116/2-2), the Bundesministerium für Bildung und Forschung (project C1 20 20: cooperation project WTZ BRA – Health of marine ecosystems, and Center of Excellence *BIOTECmarin*) and the International Human Frontier Science Program (RG-333/96-M).

## References

- Adell T, Grebenjuk VA, Wiens M, Müller WEG (2003a) Isolation and characterization of two T-box genes from sponges, the phylogenetically oldest metazoan taxon. *Dev Genes Evol* 213:421–434
- Adell T, Nefkens I, Müller WEG (2003b) Polarity factor “Frizzled” in the demosponge *Suberites domuncula*: Identification, expression and localization of the receptor in the epithelium/pinacoderm. *FEBS Lett* 554:363–368
- Adell T, Thakur AN, Müller WEG (2007) Isolation and characterization of Wnt pathway-related genes from Porifera. *Cell Biol Int* 31:939–949

## 13 Stem Cell Pattern in Porifera

- Althoff K, Schütt C, Steffen R, Batel R, Müller WEG (1998) Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: Harbor also for putatively-toxic bacteria? *Mar Biol* 130:529–536
- Beisswenger C, Coyne CB, Shchepetov M, Weiser JN (2007) Role of p38 MAP kinase and transforming growth factor- $\beta$  signaling in transepithelial migration of invasive bacterial pathogens. *J Biol Chem* 282:28700–28708
- Böhm M, Schröder HC, Müller IM, Müller WEG, Gamulin V (2000) The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is conserved in metazoans: Cloning and activation of p38 of the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biol Cell* 92:95–104
- Böhm M, Hentschel U, Friedrich A, Fieseler L, Steffen R, Gamulin V, Müller IM, Müller WEG (2001) Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Mar Biol* 139:1037–1045
- Böhm M, Gamulin V, Schröder HC, Müller WEG (2002) Evolution of osmosensing signal transduction in metazoa: Stress activated protein kinases p38 and JNK. *Cell Tissue Res* 308:431–438
- Borojevic R (1966) Étude expérimentale de la différenciation des cellules de l'éponge au cours de son développement. *Dev Biol* 14:130–153
- Borojevic R (1970) Différenciation cellulaire dans l'embryogenèse et la morphogenèse chez les spongiaires. *Symp Zool Soc Lond* 25:467–490
- Borojevic R (1971) Le comportement des cellules d'éponge lors de processus morphogénétique. *Ann Biol* 10:533–545
- Brusca RC, Brusca GJ (1990) Invertebrates. Sunderland, Mass, Sinauer
- Cai JC, Weiss ML, Rao MS (2004) In search of "stemness". *Exp Hematol* 32:585–598
- Cho HH, Bae YC, Jung JS (2006) Role of Toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells* 24:2744–2752
- Cory S, Adams JM (1998) Matters of life and death: Programmed cell death at Cold Spring Harbor. *Biochim Biophys Acta* 1377:R25–R44
- Custodio MR, Prokic I, Steffen R, Koziol C, Borojevic R, Brümmer F, Nickel M, Müller WEG (1998) Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: A model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech Ageing Dev* 105:45–59
- Davletov BA, Suedhof TC (1993) A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity  $\text{Ca}^{2+}$ /phospholipid binding. *J Biol Chem* 268:26386–26390
- Diaz JP (1977) Transformation histologiques et cytologiques post-traumatiques chez la demo-sponge *Suberites massa* Nardo. *Bull Museum Natural History Nature (Paris)* 445:375–396
- Diaz JP (1979) Variations, différenciations et fonctions des catégories cellulaires de la demo-sponge d'eaux saumâtres, *Suberites massa*, Nardo, au cours du cycle biologique annuel et dans des conditions expérimentales. Thèse, Université des Sciences et techniques du Languedoc, Montpellier
- Felsenstein J (1993) PHYLIP, ver. 3.5. University of Washington, Seattle
- Friedrich AB, Merkert H, Fendert T, Hacker J, Proksch P, Hentschel U (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Mar Biol* 134:461–470
- Galliot B, Miller D (2000) Origin of anterior patterning – how old is our head? *Trends Genetics* 16:1–5
- Garrone R (1978) Phylogenesis of Connective Tissue. Morphological Aspects and Biosynthesis of Sponge Interacellular Matrix. Karger S, Basel
- Grunz H (ed) (2004) The Vertebrate Organizer. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Hoshiyama D, Suga H, Iwabe Y, Koyanagi M, Nikoh N, Kuma K, Matsuda F, Honjo T, Miyata T (1998) Sponge Pax cDNA related to Pax-2/5/8 and ancient gene duplications in the Pax family. *J Mol Evol* 47:640–648
- Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR (2000) Cutting edge: Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. *J Immunol* 165:3541–3544

- 1126 Jones L (2001) Stem cells: So what's in a niche? *Curr Biol* 11:R484–R486
- 1127 Krasko A, Schröder HC, Batel R, Grebenjuk VA, Steffen R, Müller IM, Müller WEG (2002)
- 1128 Iron induces proliferation and morphogenesis in primmorphs from the marine sponge *Suberites*
- 1129 *domuncula*. *DNA Cell Biol* 21:67–80
- 1130 Laurent L (1842) Recherches sur l'hydre et l'éponge d'eau douce. Arthus Bertrand, Paris
- 1131 Lee MS, Kim YJ (2007) Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular,
- 1132 membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* 23:1–10
- 1133 Müller WEG (2001) How was metazoan threshold crossed: The hypothetical Urmetazoa. *Comp*
- 1134 *Biochem Physiol [A]* 129:433–460
- 1135 Müller WEG (2005) Spatial and temporal expression patterns in animals. In: Meyers RA (ed)
- 1136 *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, vol 13. WILEY-VCH Press,
- 1137 Weinheim. pp 269–309
- 1138 Müller WEG (2006) The stem cell concept in sponges (Porifera): Metazoan traits. *Semin Cell Dev*
- 1139 *Biol* 17:481–491
- 1140 Müller WEG, Blumbach B, Wagner-Hülsmann C, Lessel U (1997) Galectins in the phylogeneti-
- 1141 cally oldest metazoa, the sponges [Porifera]. *Trends Glycosci Glycotechn* 9:123–130
- 1142 Müller WEG, Wiens M, Batel R, Steffen R, Borojevic R, Custodio MR (1999a) Establishment of
- 1143 a primary cell culture from a sponge: Primmorphs from *Suberites domuncula*. *Mar Ecol Progr*
- 1144 *Series* 178:205–219
- 1145 Müller WEG, Blumbach B, Müller IM (1999b) Evolution of the innate and adaptive immune
- 1146 systems: Relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum
- 1147 [Porifera] and those in vertebrates. *Transplantation* 68:1215–1227
- 1148 Müller WEG, Perovic S, Wilkesman J, Kruse M, Müller IM, Batel R (1999c) Increased gene
- 1149 expression of a cytokine-related molecule and profilin after activation of *Suberites domuncula*
- 1150 cells with xenogeneic sponge molecule(s). *DNA Cell Biol* 18:885–893
- 1151 Müller WEG, Schröder HC, Skorokhod A, Bünz C, Müller IM, Grebenjuk VA (2001) Contribution
- 1152 of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmetazoa).
- 1153 *Gene* 276:161–173
- 1154 Müller WEG, Krasko A, Skorokhod A, Bünz C, Grebenjuk VA, Steffen R, Batel R, Müller IM,
- 1155 Schröder HC (2002) Histocompatibility reaction in the sponge *Suberites domuncula* on tissue
- 1156 and cellular level: Central role of the allograft inflammatory factor 1. *Immunogenetics* 54:48–58
- 1157 Müller WEG, Wiens M, Müller IM, Schröder HC (2003a) The chemokine networks in sponges:
- 1158 Potential roles in morphogenesis, immunity and stem cell formation. *Progr Mol Subcell Biol*
- 1159 *34*:103–143
- 1160 Müller WEG, Korzhev M, Le Pennec G, Müller IM, Schröder HC (2003b) Origin of metazoan
- 1161 stem cell system in sponges: First approach to establish the model (*Suberites domuncula*).
- 1162 *Biomolecular Engineering* 20:369–379
- 1163 Müller WEG, Wiens M, Adell T, Gamulin V, Schröder HC, Müller IM (2004) Bauplan of
- 1164 Urmetazoa: Basis for Genetic Complexity of Metazoa. *Internat Rev Cytol* 235:53–92
- 1165 Noll FC (1888) Beiträge zur Naturgeschichte der Kieselschwämme. *Abhandlungen*
- 1166 *Senckenbergische Naturforscher Gesellschaft Frankfurt* 2:1–58
- 1167 Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in
- 1168 *Drosophila*. *Nature* 287:795–801
- 1169 Ogawa K, Ishihara S, Saito Y, Mineta K, Nakazawa M, Ikeo K, Gojobori T, Watanabe K, Agata K
- 1170 (2002) Induction of a noggin-like gene by ectopic DV interaction during planarian regeneration.
- Dev Biol* 250:59–70
- 1171 Perovic S, Schröder HC, Sudek S, Grebenjuk VA, Batel R, Štifanic M, Müller IM, Müller WEG
- 1172 (2003) Expression of one sponge *Iroquois* homeobox gene in primmorphs from *Suberites*
- 1173 *domuncula* during canal formation. *Evol Dev* 5:240–250
- 1174 Perović-Ottstadt S, Adell T, Proksch P, Wiens M, Korzhev M, Gamulin V, Müller IM, Müller
- 1175 WEG (2004a) A (1→3)-β-D-glucan recognition protein from the sponge *Suberites domuncula*:
- 1176 Mediated activation of fibrinogen-like protein and epidermal growth factor gene expression.
- 1177 *Europ J Biochem* 271:1924–1937

## 13 Stem Cell Pattern in Porifera

- Perović-Ottstadt, S., Četković, H., Gamulin, V., Schröder, H.C., Kropf, K. Moss C, Korzhev M, Diehl-Seifert B, Müller IM, Müller WEG (2004b) Molecular markers for germ cell differentiation in the demosponge *Suberites domuncula*. *Int J Dev Biol* 48:293–305
- Pfeifer K, Haasemann M, Gamulin V, Bretting H, Fahrenholz F, Müller WEG (1993) S-type lectins occur also in invertebrates: High conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiology* 3:179–184
- Pilcher H (2005) Back to our roots. *Nature* 435:1022–1023
- Saitou N, Nei M (1987) Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Schmidt EW, Obratzsova AY, Davidson SK, Faulkner DJ, Haygood MG (2000) Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel delta-proteobacterium, 'Candidatus Enttheonella palauensis'. *Mar Biol* 136: 969–977
- Schmidt O (1862) Die Spongien des Adriatischen Meeres. Engelmann W, Leipzig
- Schröder HC, Krasko A, Batel R, Skorokhod A, Pahler S, Kruse M, Müller IM, Müller WEG (2000) Stimulation of protein (collagen) synthesis in sponge cells by a cardiac myotrophin-related molecule from *Suberites domuncula*. *FASEB J* 14:2022–2031
- Schröder HC, Krasko A, Le Pennec G, Adell T, Hassanein H, Müller IM, Müller WEG (2003) Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: Contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge *Suberites domuncula*. *Progr Mol Subcell Biol* 33:249–268
- Schröder HC, Natalio F, Wiens M, Tahir MN, Shukoor MI, Tremel W, Belikov SI, Krasko A, Müller WEG (2008) The 2'-5'-oligoadenylate synthetase in the lowest Metazoa: Isolation, cloning, expression and functional activity in the sponge *Lubomirskia baicalensis*. *Mol Immunol* 45:945–953
- Schulze FE (1904) Hexactinellida. Wissenschaftliche Ergebnisse der Deutschen Tiefsee-Expedition, vol 4. Fischer-Verlag, Jena
- Scott MG, Vreugdenhil AC, Buurman WA, Hancock RE, Gold MR (2000) Cutting edge: Cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS-binding protein. *J Immunol* 164:549–553
- Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726–735
- Segura-Pena D, Lutz S, Monnerjahn C, Konrad M, Lavie A (2007) Binding of ATP to TK1-like enzymes is associated with a conformational change in the quaternary structure. *J Mol Biol* 369:129–141
- Sen S, Kundu G, Mekhail N, Castel J, Misono K, Healy B (1990) Myotrophin: Purification of a novel peptide from spontaneously hypertensive rat heart that influences myocardial growth. *J Biol Chem* 265:16635–16643
- Sewalt RGAB, Vlag J, Gunster MJ, Hamer KM, Blaauwen JL, Satijn DPE, Hendrix T, Driel R, Otte AP (1998) Characterization of interactions between mammalian Polycomb-group proteins Enx/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian Polycomb-group protein complexes. *Mol Cell Biol* 18:3586–3595
- Sil P, Kandaswamy V, Sen S (1998) Increased protein kinase C activity in myotrophin-induced myocyte growth. *Circ Res* 82:1173–1188
- Simpson TL (1984) The cell biology of sponges. Springer-Verlag, New York
- Smith WC, Harland RM (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70:829–840
- Smith WC, Knecht AK, Wu M, Harland RM (1993) Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing mesoderm. *Nature* 361:547–549
- Sollas WJ (1888) Tetractinellida. In: Wyville Thomson C (ed) Report on the scientific results of the voyage of HMS Challenger. Eyre & Spottiswoode, London, pp 1–453
- Thakur NL, Hentschel U, Krasko A, Pabel CT, Anil AC, Müller WEG (2003) Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: Potential basis for the defense. *Aquatic Microbiol Ecol* 31:77–83



- Ulevitch RJ, Tobias PS (1994) Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr Opin Immunol* 6:125–130
- Vacelet J, Vacelet E, Gaino E, Gallissian MF (1994) Bacterial attack of spongin skeleton during the 1986–1990 Mediterranean sponge disease. In Van Soest RWM, Van Kempen TMG, Braekman JC (eds) *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam, pp 355–362
- Valenzuela DM, Economides AN, Rojas E, Lamb TM, Nunez L, Jones P, Ip NY, Espinosa R, Brannan CI, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, LeBeau MM, Harland RM, Yancopoulos GD (1995) Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 15:6077–6084
- Wagner AJ, Weissman IL (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639–648
- Wagner C, Steffen R, Koziol C, Batel R, Lacorn M, Steinhart H, Simat T, Müller WEG (1998) Apoptosis in marine sponges: A biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). *Mar Biol* 131:411–421
- Wiens M, Mangoni A, D'Esposito M, Fattorusso E, Korchagina N, Schröder HC, Grebenjuk VA, Krasko A, Batel R, Müller IM, Müller WEG (2003) The molecular basis for the evolution of the metazoan bodyplan: Extracellular matrix-mediated morphogenesis in marine demosponges. *J Mol Evol* 57:S60–S75
- Wiens M, Perović-Ottstadt S, Müller IM, Müller WEG (2004) Allograft rejection in the mixed cell reaction system of the demosponge *Suberites domuncula* is controlled by differential expression of apoptotic genes. *Immunogenetics* 56:597–610
- Wiens M, Korzhnev M, Krasko A, Thakur NL, Perović-Ottstadt S, Breter HJ, Ushijima H, Diehl-Seifert B, Müller IM, Müller WEG (2005) Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway: Induction of a perforin-like molecule. *J Biol Chem* 280:27949–27959
- Wiens M, Belikov SI, Kaluzhnaya OV, Krasko A, Schröder HC, Perovic-Ottstadt S, Müller WEG (2006) Molecular control of serial module formation along the apical-basal axis in the sponge *Lubomirskia baicalensis*: Silicateins, mannose-binding lectin and Mago Nashi. *Dev Genes Evol* 216:229–242
- Wilkinson CR, Garrone R, Vacelet J (1984) Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: Electron microscope radioautography and in situ evidence. *Proc R Soc Lond B* 220:519–528
- Wilson HV (1907) On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J Exp Zool* 5:245–258
- Wimmer W, Blumbach B, Diehl-Seifert B, Koziol C, Batel R, Steffen R, Müller IM, Müller WEG (1999a) Increased expression of integrin and receptor tyrosine kinase genes during autograft fusion in the sponge *Geodia cydonium*. *Cell Adhes Comm* 7:111–124
- Wimmer W, Perovic S, Kruse M, Krasko A, Batel R, Müller WEG (1999b) Origin of the integrin-mediated signal transduction: Functional studies with cell cultures from the sponge *Suberites domuncula*. *Eur J Biochem* 178:156–165
- Wolpert L (1998) *Principles of development*. Oxford University Press, Oxford
- Yoshikawa T, Nagasugi Y, Azuma T, Kato M, Sugano S, Hashimoto K, Masuho Y, Muramatsu M, Seki N (2000) Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem Bioph Res Comm* 275:532–537
- Zou GM, Reznikoff-Etiénat MF, Milliez J, Léon W, Hirsch F (2000) Fas-mediated apoptosis of mouse embryo stem cells: Its role during embryonic development. *Am J Reprod Immunol* 43:240–248

# Chapter 13

Q. No.	Query
AQ1	Please provide “Keywords”.
AQ2	"Bergquist 1978" is not listed in the reference list. Please provide.
AQ3	"Müller and Schäcke 1996" is not listed in the reference list. Please provide.
AQ4	"Müller 2007" is not listed in the reference list. Please provide.
AQ5	"Yang et al. 2000" is not listed in the reference list. Please provide.



## Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution

A. Châtel<sup>a,c,\*</sup>, B. Hamer<sup>b</sup>, H. Talarmin<sup>a</sup>, G. Dorange<sup>a</sup>, H.C. Schröder<sup>c</sup>, W.E.G. Müller<sup>c</sup>

<sup>a</sup> EA 4326 Facteurs nerveux et structuration tissulaire, Institut de Synergie des Sciences et de la Santé, 22 Avenue Camille Desmoulins C.S. 93837, 29238 Brest cedex 03, France

<sup>b</sup> Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, Laboratory for Marine Molecular Biology, Giordano Paliaga 5, HR-52210 Rovinj, Croatia

<sup>c</sup> Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Johannes Gutenberg Universität, Duesbergweg 6, D-55099 Mainz, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 July 2009

Received in revised form 29 October 2009

Accepted 3 November 2009

#### Keywords:

Pollution

Biomarker

MAP kinase

Mussel

*Mytilus galloprovincialis*

Tributyltin

Diesel oil

Hydrogen peroxide

### ABSTRACT

Stimulation of MAP kinase signal transduction pathway by various stressful stimuli was investigated in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. Analyses were performed in animals exposed in laboratory to selected pollutants and in mussels collected in winter and summer along the eastern Adriatic coast (Croatia). Effects of oxidative stress, induced by tributyltin, hydrogen peroxide and water soluble fraction of diesel fuel on the activation/phosphorylation of the three Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) p38, JNK and ERK using a newly developed ELISA procedure were evaluated. MAP kinase activation was analyzed 1 h after exposure of mussels to chemical agents, and after recovery periods of 6 and 24 h. Our results clearly indicated that pollutants generated different patterns of induction of the MAPK phosphorylation. Indeed, only pp38 and pJNK were activated with 11, 33 and 100 µg/L TBT, reaching a maximum activation after 6 h in seawater following treatment of mussels with 11 µg/L TBT. Treatment with 0.074 and 0.222 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhanced activation of both p38 and ERK. These two kinases were activated after 1 h exposure, followed by a diminution after 6 h of recovery in seawater and a reactivation after 24 h. The levels of phosphorylated P38 and JNK were increased after mussel exposure with 7.5, 15 and 30% of water soluble fraction of diesel oil. P38 was activated concentration dependently at 1 h exposure. Additionally, field study pointed out seasonal differences in MAP kinases activation as mussels collected during summer had a higher enzyme activation state than in winter, as well as sampling site differences which could be correlated to the industrial/tourism activity and environmental stresses (salinity). All the results converge towards MAP kinase signaling pathway being induced by various pollutants in *M. galloprovincialis*. This signaling cascade should be considered as a possible biomarker of environmental stress and pollution.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

A multidisciplinary approach for environmental monitoring provides the assessment of the pollution effects on target organisms using several methods. In the framework of studies on marine environmental contamination, the monitoring of harbours as well as industrial and touristic areas represents very interesting and challenging research (Magi et al., 2008). Benthic organisms and especially bivalves, are widely used as sentinel species for monitoring coastal environments (Santovito et al., 2005). Among them, the mussel *Mytilus galloprovincialis*, a filter-feeding organism (accumulation), is a desirable bioindicator species (Petrovic et al., 2004; Jaksic et al., 2005).

In order to obtain a more integrated evaluation of the effects of pollutant exposure in biological systems, the use of biomarkers has been introduced in monitoring programs. Many biomarkers, such as biomarkers of exposure, indicative of environmental stress and biomarkers of effects, indicative of pollutant exposure, have been used to monitor stress level in aquatic organisms exposed to environmental pollutants. However the main difficulty of using biomarkers is the interference of natural environmental factors, together with the pollution, in their biological response (Hamer et al., 2008).

Different techniques have been used with a general tendency to use cellular and molecular tools providing early warnings of physiological alterations in organisms exposed to environmental stress/pollution (Gundert-Remy et al., 2005). In this field, a promising area of investigation is cell signaling, the whole mechanisms allowing the transduction of extracellular stimuli into modulatory processes of cellular activities (Burlando et al., 2006). Laboratory studies have shown the potential of using different responses/processes of the cell signaling such as heat shock

\* Corresponding author at: EA 4326, Facteurs nerveux et structuration tissulaire, Institut de Synergie des Sciences et de la Santé, 22 Avenue Camille Desmoulins C.S. 93837, 29238 Brest cedex, France.

E-mail address: [amelie.chatel@univ-brest.fr](mailto:amelie.chatel@univ-brest.fr) (A. Châtel).

proteins, metallothionein, DNA integrity, cytochrome P4501A, acetylcholine esterase activity, etc. (Schröder et al., 2000; Bihari et al., 2002; Jaksic and Batel, 2003; Hamer et al., 2004; Pfeifer et al., 2005; Magni et al., 2006). Among the proteins of the cell signaling cascade, the Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) are important amplifying modules that can transduce stress signals into cellular responses (Kultz and Avila, 2001; Poonam et al., 2002; Ranganna et al., 2002). The MAP kinases are implicated in various physiological responses (Kyriakis et al., 2001). It is a superfamily of protein Ser/Thr-kinases, a widely distributed group of enzymes that have been highly conserved through evolution (Böhm et al., 2002; Müller et al., 2002; Kyriakis and Avruch, 2001; Roux and Blenis, 2004). Three subfamilies of the MAPKs have been clearly identified and extensively studied in mammalian experimental models: the extracellular regulated protein kinase (ERK), the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases (JNK) and the p38-MAPK. Although ERKs are mainly involved in mediating anabolic processes such as cell division, growth and differentiation, JNKs and p38-MAPKs are generally associated with cellular response to diverse stresses and can be involved in either anti-apoptotic or pro-apoptotic mechanisms, depending on their isoform and/or cell type (Roux and Blenis, 2004; Wada and Penninger, 2004).

To our knowledge, the MAP kinases are not used as biomarkers of pollution in marine invertebrates but the mechanisms leading to their activation have been investigated in recent years. Studies have focused principally on MAP kinase activation in response to various stimuli such as heavy metals (Kefaloyianni et al., 2005; Burlando et al., 2006; Canesi et al., 2001), bacterial exposure (Canesi et al., 2002a,b), hormones (Canesi et al., 2004a,b, 2006), physico-chemical parameters such as salinity and temperature (Gaitanaki et al., 2004; Anestis et al., 2007; Hamer et al., 2008).

Under normal physiological conditions, animals maintain a balance between generation and neutralization of reactive oxygen species (ROS). But when organisms are exposed to pollutants (eg. heavy metals, tributyltin or polyaromatic hydrocarbons (PAHs)), the rate of production of ROS (like O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) exceeds their scavenging activity producing damage to cell components. The consequence of this oxidative stress is the activation of antioxidant defense mechanisms like SOD, CAT and GPX (for the enzymatic processes) and β-carotene, GSH, vitamin E and vitamin C (for the non-enzymatic processes) (Cavaletto et al., 2002). Oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been shown to induce an increase in MAPK phosphorylation in marine invertebrates as in *M. galloprovincialis*, in amphibians (Gaitanaki et al., 2003) and in ascidian embryos (Damiani et al., 2009).

In the current study, the effects of two pollutants potentially present in Adriatic sea were investigated as it presents important harbour activity and commercial exchange: TBT, used as antifouling paint for ships and diesel oil, which is a commonly used fuel. Moreover, the effects of environmental factors/pollution (field) on the activation/phosphorylation of the MAP kinases have been investigated in the mussel *M. galloprovincialis*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Organism and investigated area

Mussels *M. galloprovincialis* were obtained from a mariculture facility Riviera (Limski kanal, Northern Adriatic, Croatia). Animals were transferred to laboratory aquaria and kept in running seawater (SW) for acclimation a few days before the experiments. In the field study, mussels were collected at altogether 19 sampling stations along the Adriatic coast during winter and summer seasons 2007 (Fig. 1).

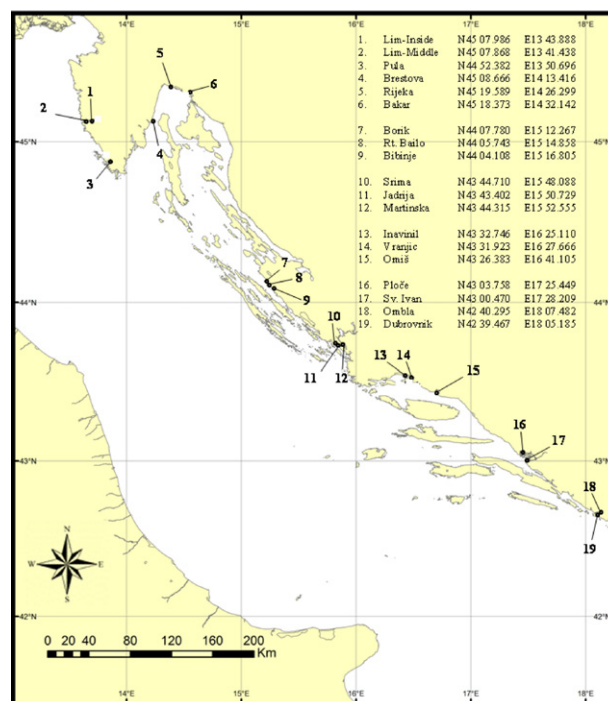


Fig. 1. Investigated sites of the Croatian eastern coastal area of Adriatic sea.

### 2.2. Preparation of water soluble fraction of diesel oil

1 L of fresh diesel fuel obtained from a filling station was mixed with 4 L of seawater and stirred slowly for 24 h, in order to increase the dissolution of the water soluble components of the diesel oil. The mixture was then left to settle for 3 h before it was poured into separating funnels and allowed to stand overnight, in order to obtain a clean oil–water interphase. The water soluble fraction (WSF) of the diesel oil, the layer on the bottom, was decanted into containers.

### 2.3. Mussel treatments

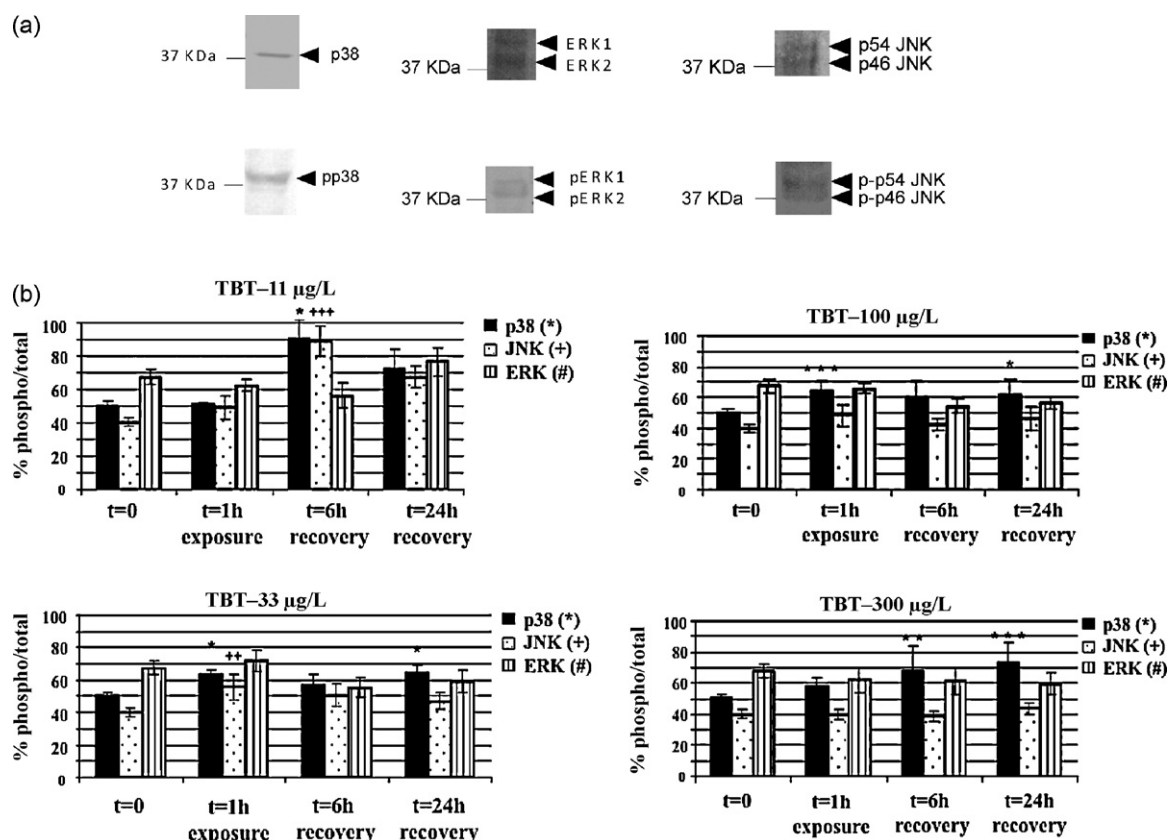
Mussels were exposed to tributyltin (T50202, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany), hydrogen peroxide (30% (w/w) H1009, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany), and to WSF of diesel fuel at different concentrations for 1 h using 1 L of SW and aeration, followed by recovery in running seawater for 6 and 24 h. After incubation and recovery periods, mussels ( $n=3$ ) were dissected and both gills were taken, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

For field studies, mussels were collected from sites 1–6 and delivered to laboratory within 1 h. Other collection sites were grouped: Zadar (7–9), Sibenik (10–12), Split (13–15) and Ploče (16, 17), Dubrovnik (18, 19) to minimize the handling/transport stress. Gills of mussel were dissected at the place of last collection site of the group, frozen in liquid nitrogen and transported to the laboratory, following by storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Laboratory experiments were performed at the end of summer period (September/October).

### 2.4. Preparation of mussel total protein extract

Mussel gills were homogenized in lysis buffer (1× TBS [Tris-buffered saline], pH 7.5, 1 mM EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid], 1% Nonidet-P40, 10 mM NaF [sodium fluoride], protease inhibitor cocktail [1 tablet/10 mL] (Complete Mini, ROCHE) and 1 mM sodium orthovanadate). After



**Fig. 2.** (a) Antibody cross-reactivity analysis on mussel extracts, by Western blot using anti-phospho p38, anti-p38, anti-pJNK, anti-JNK, anti-pERK and anti-ERK. (b) Effect of various TBT concentrations on MAPK activation in mussel gills. Protein extracts from controls and TBT-treated mussels were subjected to ELISA analysis using antibodies directed against the phosphorylated forms and the total p38 (A), JNK (B) and ERK (C) MAPKs. Results are given as the percentage of phosphorylated form from the total MAPK enzyme. (\*) and (\*\*), data significantly different compared to control.

homogenization, the clear supernatant was obtained by centrifugation ( $13,000 \times g/10 \text{ min}/4^\circ\text{C}$ ) and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Protein concentrations were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

#### 2.5. Determination of the phosphorylation level of MAPK by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Flat-bottomed polystyrene 96-well Pro-Bind plates (Becton Dickinson, France) were covered with  $50 \mu\text{L}$  of total protein extract ( $20 \mu\text{g}/\text{well}$ ) followed by 3 h of coating at room temperature. After washing three times with phosphate buffered saline (PBS), containing 0.05% Tween-20 (PBS/T buffer), the plates were blocked with 3% bovine serum albumin in PBS ( $150 \mu\text{L}/\text{well}$ ), overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The level of the MAPK in the protein mixture bound to the plate was detected with polyclonal antibodies raised against the phosphorylated and the total form of p38, ERK (sc-7149, sc-17852, sc-154 and sc-7383, Santa Cruz Biotechnology, California) and JNK (9251S, 9252, Cell signaling Technology, Beverly, Massachusetts). The antibodies were diluted 1:1000 in PBS/BSA 0.3% and incubated for 1 h. The immuno-complexes were detected using goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG, conjugated with horseradish peroxidase (1:10,000; Sigma, Deisenhofen, Germany) under application of the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine [TMB] substrate (53-00-01, Medac GmbH, Germany). The reaction was stopped after an appropriate time (typically 10 min) by adding 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The absorbance was measured at 450 nm using Titertek MultiScan Plus microplate reader.

#### 2.6. Statistical analysis

The results of the mussel exposure experiments are given as mean  $\pm$  S.D. of three gill samples, if not differently noted. The measured values of MAPK were compared among different groups (model agents' concentration) using the Analysis of Variance (ANOVA) followed by a Tukey post hoc test. Statistical significance was accepted at a  $P < 0.05$  throughout (\*),  $P < 0.01$  throughout (\*\*) and  $P < 0.001$  throughout (\*\*\*). A principal component analysis based on a correlation matrix was applied to assess the association among salinity (hypoosmotic stress) at investigated sites and the mussels' responses at subcellular level (p38, JNK, ERK).

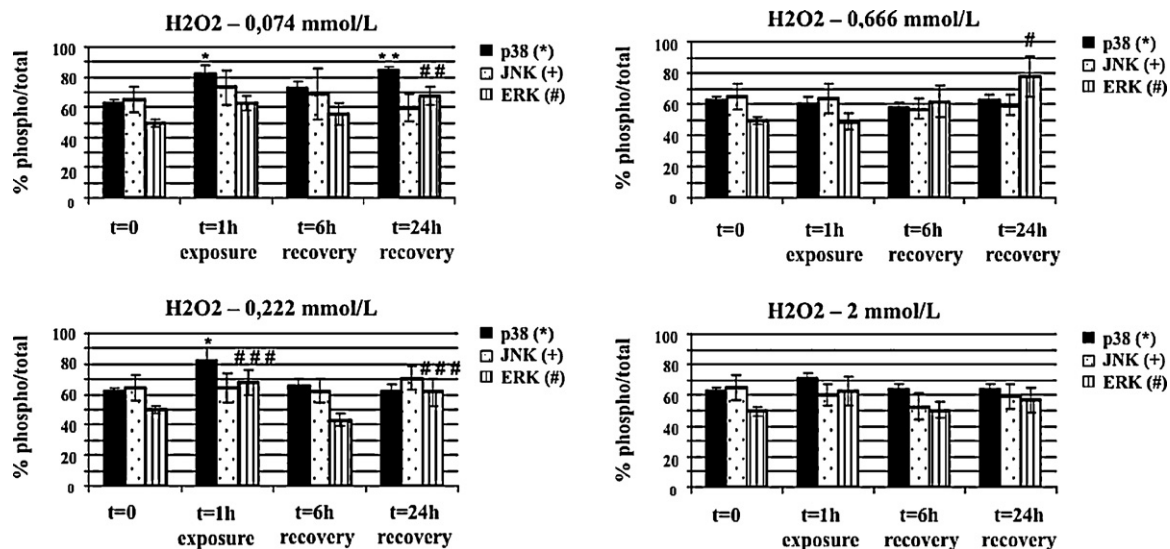
### 3. Results

#### 3.1. Effect of TBT on p38, JNK and ERK activation

Firstly, we assessed the cross-reactivity of mussel gill extracts with antibodies directed against the kinases by Western blot before the ELISA assay. Our results showed specific cross-reactivity for all antibodies tested, phosphorylated or not. Indeed, we detected p38 at a molecular weight around 37 KDa as described by Hamer et al. (2008). ERKs 1 and 2 were recognized at approximately 40 and 37 KDa, respectively. According to Betti et al. (2006), two bands were detected with antibodies anti-JNK (Fig. 2a).

Mussels were then incubated with various TBT concentrations (11–300  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) for 1 h whereas seawater was used for control bivalves. The activation/phosphorylation of the MAPK members was evaluated in gill protein extract by ELISA test using specific





**Fig. 3.** Effect of various hydrogen peroxide concentrations on MAPK activation in the mussel gills. Protein extracts from controls and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated mussels were subjected to ELISA analysis using antibodies directed against the phosphorylated forms and the total p38 (A), JNK (B) and ERK (C) MAPKs. Results are given as the percentage of phosphorylated form from the total MAPK enzyme. (\*) and (#), data significantly different compared to control.

anti-MAPK antibodies targeted against the phosphorylated form and total protein. Results are reported in Fig. 2.

At the lowest TBT concentration (11 µg/L), pp38 level was significantly increased after 1 h TBT exposure followed by a significant activation after 6 h of recovery in seawater. After 24 h, levels tended to decrease to control level. After treatment with 33 and 100 µg/L, pp38 levels were increased after 1 h exposure and remained high after 6 and 24 h of recovery in SW.

At high concentration (300 µg/L), p38 phosphorylation was quite elevated after 1 h exposure, the activation progressively increased until 24 h time point.

At the lowest concentration, the same phosphorylation pattern as mentioned before was observed for JNK. Indeed, following 1 h TBT exposure, the activation rate remained elevated for 6 h SW recovery, while a diminution was observed at 24 h.

However, for 33 and 300 µg/L, phosphorylation rates were increased at 1 h exposure followed by a decrease throughout all

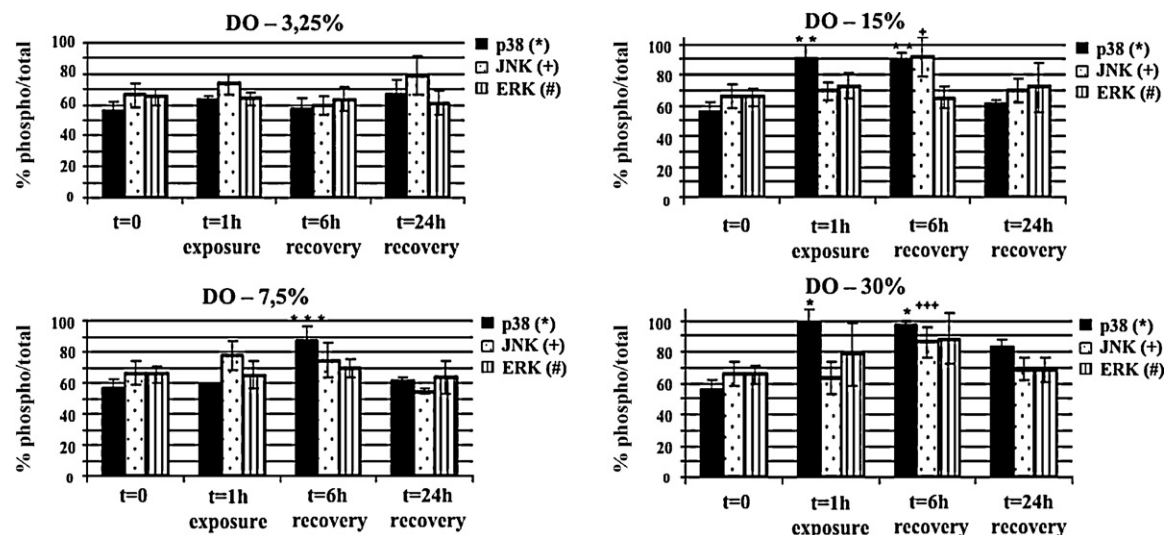
the different time points. Exposure with 300 µg/L did not increase JNK activation.

For the third MAP kinase family member, the phosphorylated ERK levels did not show any significant modifications at any time and concentration used.

### 3.2. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on p38, JNK and ERK activation

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effect on MAPK activation was afterwards evaluated using the following concentrations: 0.074, 0.222, 0.666 and 2 mmol/L (Fig. 3).

The results indicated that pp38 levels were significantly intensified after 1 h exposure to the lowest concentrations (0.074, 0.222 and 2 mmol/L). After a decrease in the activation at 6 h incubation in SW, the trend was reversed at the last time point as a significant re-activation was perceived for 0.074 mM. No significant activation was observed for 0.666 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.



**Fig. 4.** Effect of various concentrations of diesel oil (DO) water soluble fraction on MAPK activation within mussel gills. Protein extracts from controls and WSF-treated mussels were subjected to ELISA analysis using antibodies directed against the phosphorylated forms and the total p38 (A), JNK (B) and ERK (C) MAPKs. Results are given as the percentage of phosphorylated form from the total MAPK enzyme. (\*) and (\*), data significantly different compared to control.

Concerning ERK, concentrations of 0.074, 0.222 and 2 mmol/L triggered its activation at 1 h followed by a diminution at 6 h and a re-activation at 24 h. Notwithstanding, a 0.666 mmol/L concentration induced ERK phosphorylation after 6 h of recovery, followed by an increase after 24 h.

Ultimately, JNK phosphorylation levels were only modified at 1 h time point for the concentration of 0.074 mmol/L.

### 3.3. Effect of water soluble fraction of diesel oil on p38, JNK and ERK activation

Mussels were incubated with water soluble fraction (WSF) of diesel oil (3.25, 7.5, 15 and 30%) for 1 h. After 6 and 24 h in SW, the MAP kinase activation was estimated (Fig. 4).

3.25% WSF concentration did not induce p38 activation whereas 7.5% caused a significant activation after 6 h of recovery in seawater. On the contrary, high concentrations clearly induced a rapid activation after 1 h diesel exposure, progressively increasing after 6 h in SW. However at 24 h, phosphorylation rates declined. It could also be noticed that pp38 levels were activated concentration dependently after 1 h exposure.

About JNK MAP kinase, 1 h exposure to 3.25% WSF induced a slight activation, followed first by a reduction 6 h later, and then by a re-activation after 24 h. Treatment with 7.5% WSF, showed an activation after 1 h exposure, followed by a progressive reduction in phosphorylation levels at 6 and 24 h.

At high levels (15 and 30%), diesel oil induced a strong increase in JNK activation at 6 h, followed by a reduction to basal level beyond the last time bound.

Regarding pERK values, 30% of diesel oil only induced a progressive activation after 1 h exposure and 6 h of recovery, followed by a tendency for reduction after 24 h recovery.

### 3.4. Field study—effect of environmental factors and pollution on MAPK activation

Fig. 1 shows the localization of the 19 stations along the Adriatic coast during winter (March) and summer (August) in 2007. In August, the estimated average temperature and salinity values were assessed at  $24.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$  and  $33.6 \pm 1.9\text{ g/L}$ . In March, both the average temperatures and salinity decreased with the values of  $13.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$  and  $23.8 \pm 2.6\text{ g/L}$ .

Results implied that MAP kinase activation fluctuated together with seasonal variations as in general, specimens collected during summer displayed a higher activation rate compared to winter specimens. The average lines representing the average expression of the phosphorylated form, total protein and the percentage of activation compared to the total protein level of each kinase enable to distinguish several groups of stations (Figs. 5 and 6).

Globally, three groups of mussels could be distinguished: the ones collected in the north of the Adriatic coast (Lim-MariMirna, PU-PulaMarina, RI-BrestovaTrajekt, RI-RijekaLuka, RI-Bakar, ZD-ZadarBorik and ZD-ZadarRt.Bailo) exhibited a high activation of the phosphorylated forms of the three MAP kinases pp38, pJNK and pERK, mussels collected in the middle part (ZD-Bibinje, ŠI-Srima and ŠI-Jadrija) which showed a slight MAPK activation level and mussels collected in the southern part (ŠI-Jadrija, ŠI-Martinska, ST-SplitInavinil, ST-SplitVranjic, ST-Omiš, PL-Ploče, PL-MalaNeretva, DU-RijekaDubrovačka) with a high activation rate of these proteins. This same profile was observed both for summer and for winter.

Mussels collected in the stations located in the northern part, area with high industrial activity, showed important pp38 level in winter and in summer compared to mussels collected in other areas. In addition, high level of activation rates of pJNK and pERK were observed in these stations only during winter, when the salinity and temperature were lowered.

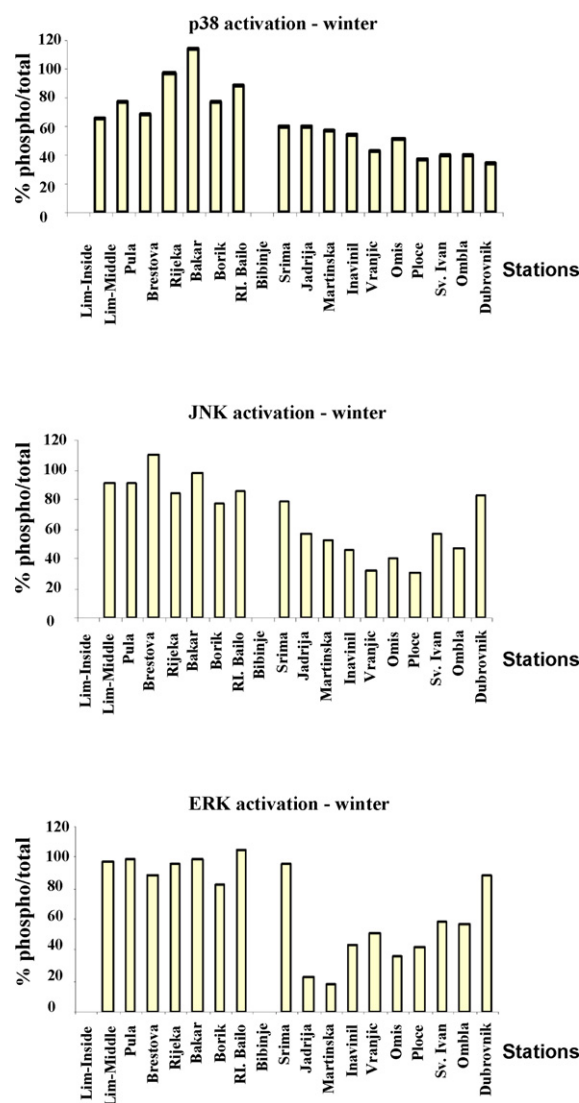
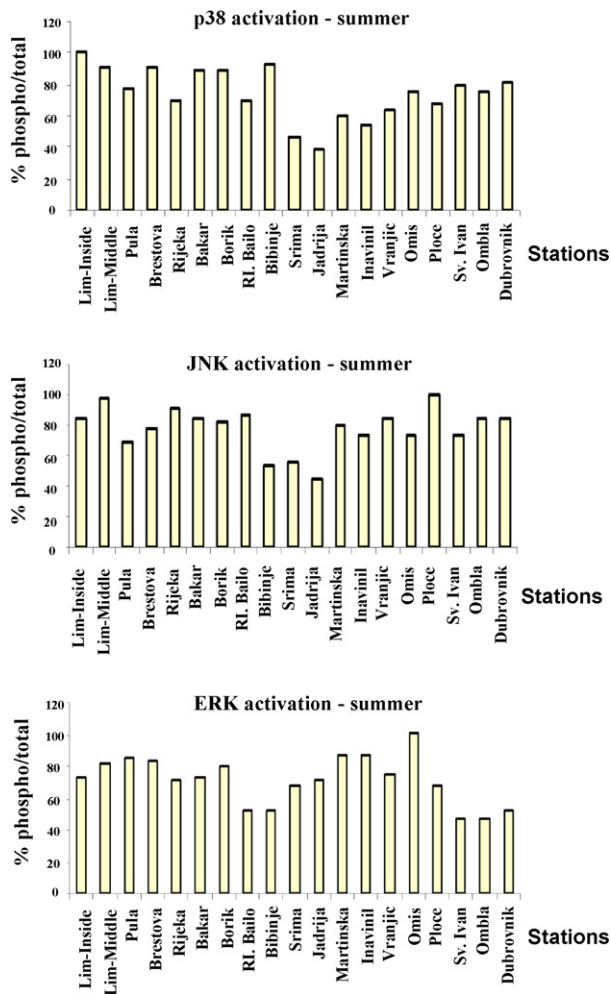


Fig. 5. Effect of factors in the sampling site during the winter season on MAPK phosphorylation in mussel gills. Protein extracts from controls and TBT-treated mussels were subjected to ELISA analysis using the antibodies anti-p38 MAPK (A), JNK MAPK (B) and ERK MAPK (C).

Concerning mussels collected in the middle part of the coast, pp38, pJNK and pERK levels were low during both seasons.

Conversely, stations in the southern part of the Adriatic sea (ŠI-Jadrija, ŠI-Martinska, ST-SplitInavinil, ST-SplitVranjic, ST-Omiš, PL-Ploče, PL-MalaNeretva, DU-RijekaDubrovačka) displayed a high level of all MAPKs in summer. The levels were low in winter.

As described in Table 1, there was a significant correlation between the expression of different enzymes and the environmental parameters (salinity and temperature). Results showed that temperature and salinity effects were interrelated. In fact, during winter, the correlation between total p38 and total JNK was 0.86, for p38 and ERK 0.77 and ultimately between JNK and ERK 0.91. As a consequence, no significant correlation was observed between MAP kinase activation and seawater environmental conditions during winter season. Similarly, during summer, a strong correlation was found between p38 and JNK (0.95). Additionally, it turned out that pp38, p38, pJNK, JNK and ERK expressions were both influenced, first by seawater temperature (correlation of 0.45, 0.32, 0.43, 0.49 and 0.33, respectively) then via their own interactions, but not by salinity. pERK differed from all these observations as neither temperature (correlation coefficient



**Fig. 6.** Effect of factors in the sampling site during the summer season on MAPK phosphorylation in mussel gills. Protein extracts from controls and TBT-treated mussels were subjected to ELISA analysis using the antibodies anti-p38 MAPK (A), JNK MAPK (B) and ERK MAPK (C).

0.04), nor the other kinases had any influence on its expression rate.

#### 4. Discussion

Among the marine bivalves, the mussel *M. galloprovincialis* often faces various stressful environmental conditions such as variations of temperature, salinity and oxygen concentration, but also faces the presence of various contaminants which lead to oxidative stress. Oxyradicals can be highly toxic to animals, often resulting in lipid peroxidation in membranes, altering pyridine nucleotide redox status, and in DNA damage (Frenzilli et al., 2001). ROS formation and subsequent damage are balanced by an array of cellular antioxidant defenses together with the induction of the signaling cascade. Among the signaling pathways involved in this adaptation, the MAPK signaling cascade has been shown to play a significant role (Kyriakis and Avruch, 2001). Indeed, Gaitanaki et al. (2004) showed that oxidative stress induced a time-dependant activation of p38 in *M. galloprovincialis* mantle. Activation of MAPK is crucial in the immune response of *Mytilus* hemocytes (Canesi et al., 2002a,b, 2005) since it has been shown that a rapid, sustained, but transient activation/phosphorylation of both p38 and JNK MAPK is associated with efficient bacterial killing (Canesi et al., 2005), whereas persistent phosphorylation by environmental contaminants is associated with cellular damage and immunotoxic effects (Canesi et al., 2003).

In this study, the effect of pollutants (TBT,  $H_2O_2$  and diesel oil) on the activation/phosphorylation of the three MAPKs: p38, JNK and ERK was investigated to understand the mechanisms implicated in the cellular response of the mussels to oxidative stress in order to find/evaluate new biomarkers for biomonitoring studies. Moreover, because it is necessary to estimate the influence of environmental factors and pollution, the MAPK activation was also evaluated in mussels collected at 19 sampling sites along the Adriatic coast. A new biotest has been applied for the measurement of MAPK activation (Müller et al., in press). In addition, biomarker evaluation after long period of recovery of the animals should give a realistic picture of their life conditions.

##### 4.1. Activation of MAP kinases signaling pathway by selected marine pollutants (oxidative stress)

TBT, a strong lipophilic substance, is one of the organotin compounds present in the seawater. It was used in high quantities for

**Table 1**

Correlation between salinity, temperature and the MAPKs: (A) summer and (B) winter.

(A) Summer	T°C	Salinity	p38	pp38	JNK	pJNK	ERK	pERK
T°C	1							
Salinity	0.775775	1						
p38	−0.454931	−0.051344	1					
pp38	−0.320356	0.077607	0.913020	1				
JNK	−0.431480	−0.084389	0.957304	0.898982	1			
pJNK	−0.496715	−0.138552	0.835660	0.844538	0.835088	1		
ERK	−0.388773	−0.129836	0.868143	0.928177	0.872224	0.856002	1	
pERK	−0.044428	−0.04839	0.359016	0.437627	0.272843	0.492331	0.564520	1
(B) Winter	T°C	Salinity	p38	pp38	JNK	pJNK	ERK	pERK
T°C	1							
Salinity	0.579583	1						
p38	0.152632	−0.111337	1					
pp38	−0.117647	0.056620	−0.596090	1				
JNK	−0.067262	−0.241920	0.867284	−0.672542	1			
pJNK	0.179263	0.371957	−0.457935	0.634969	−0.608033	1		
ERK	−0.086799	−0.200366	0.770302	−0.744992	0.913497	−0.632966	1	
pERK	−0.000423	0.310753	−0.496363	0.248370	−0.410878	0.602607	−0.424208	1

A positive correlation was found between the following variables: p38 and JNK; pp38 and temperature; p38 and temperature; pJNK and temperature; JNK and temperature; ERK and temperature. A positive correlation was found between the following variables: p38 and JNK; p38 and ERK; JNK and ERK.



wood preservation, antifouling paints, disinfection of circulating industrial water, and slime control in paper mills (Kannan et al., 1998; Karpiak et al., 2001). Even though, recommendations have been made by the International Maritime Organization (IMO) to internationally prohibit the use of organotin compounds as biocides in antifouling paints by January, 2008, it remains a widespread environmental contaminant (Kimbrough, 1976; Tanabe et al., 1998). Our results clearly showed that only p38 and JNK were activated with 11, 33 and 100 µg/L TBT concentrations, reaching maximum activation after 6 h in SW following mussel treatment with 11 µg/L. However, in rainbow trout exposed to TBT, Urushibara et al. (2009) showed an activation of all MAPK concentration- and time-dependently, with a highest activity for p38, also observed in our results. Gaitanaki et al. (2004) suggested that in the mantle of *M. galloprovincialis*, the substrates of p38 MAPK are located in the cytoplasm rather than in the nuclear compartment. Thus, the MAPK may be re-activated by their upstream or downstream substrates (Kyriakis and Avruch, 1996), explaining the persistence of phosphorylation after 6 and 24 h of recovery.

The same samples from *M. galloprovincialis* have been subjected to DNA damage/integrity analysis performed by Fast micromethod® (Hamer et al., 2009) and it was observed that reduction of DNA damage was associated with activation of p38 and JNK after TBT withdrawal. At the concentrations used in this study, these two kinases appeared to play a role in cell survival. Recently, it has been demonstrated the function of p38MAPK/MK2 pathway in survival after DNA damage in murine p53-deficient cells (Reinhardt et al., 2007).

However, no significant effect of TBT on pERK, a MAPK known to have an important role in cell protection in mammalian model was noticed, but a tendency to decline could be visible.

The effects of TBT treatment on ERK1/2 response in ascidian embryos showed that concentrations of 0.1, 0.25 and 0.5 µM of TBT induced a slight decrease in half activation of ERK (concentrations similar to the ones used in this study) whereas very high concentrations (up to 10 µM) induced a stronger decrease of its phosphorylation (Damiani et al., 2009).

Batel et al. (1993) showed that in the cells of the sponge *Geodia cydonium*, TBT treatment not only causes DNA damage but also stimulates the expression of the stress protein Hsp70, which could be an activator of p38 and JNK since their interaction is highly suspected. Indeed, Hamer et al. (2009) have demonstrated a strong induction of Hsp70 expression in *M. galloprovincialis* at the same concentrations and times that activated p38 in our study, hence indicating a possible correlation between p38 and Hsp70 in the mussel (Malagoli et al., 2004; Fabbri et al., 2008).

Concerning H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, it is known to enter the cell via diffusion through ANC (anion-channel). Our results showed an activation of p38 after exposure with 0.074 and 0.222 mM for 1 h. For all the concentrations and times, we observed an activation of ERK. Both p38 and ERK were following the same activation curve: activation after 1 h exposure, followed by a decrease in activity after 6 h of recovery in seawater and a reactivation after 24 h. These results are in line with previous studies showing an activation of p38 and ERK after 1 h exposure with low concentration (10 µM) in mantle of *M. galloprovincialis* (Gaitanaki et al., 2003) and in amphibian cells (Carter et al., 2002). In our study, ERK was activated more importantly with this chemical, compared to the others tested.

While comparing these results with DNA damage, it was supposed that cell recovery was dependent on both p38 and ERK activation after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. Blunt et al. (2007) made the hypothesis that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes the activation of p38 which initiates translocation of heat shock protein 25/27 (Hsp25/27) responsible for rat ventricular myocyte survival.

However, no significant activation was observed for JNK. Masuda et al. (2003) supposed that activation of ERK may induce

phosphorylation of a MAPK phosphatase 7 (MKP-7) which preferably inactivates JNK. In addition, it has also been demonstrated that overexpression of Hsp70 can inhibit JNK activation by various stimuli including heat shock, UV light, as well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through a mechanism involving the direct binding of Hsp70 to JNK (Park and Liu, 2001).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are major pollutants in the environment. They are produced by incomplete combustion of carbonaceous materials (Collins et al., 1998). They are introduced in the environment from a variety of sources including forest fires, volcanic eruptions, diesel, tobacco (White et al., 1994). PAH, as lipophilic molecules, are metabolized by the cytochrome P450 monooxygenase family (CYP1), thereby forming highly reactive metabolites which form DNA adducts (Pelkonen and Nebert, 1982). The CYP1A1-dependent metabolism leads to an early production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In this study, mussels showed an activation of 2 MAPKs following exposure with water soluble fraction of diesel oil. Protein pp38 and pJNK levels were enhanced from 1 h exposure with all concentrations of diesel. It could be noticed that p38 was activated concentration dependently at 1 h exposure. This is in agreement with the study of Burlando et al. (2006) who have shown an increase in the phosphorylation of the protein tyrosine kinases (including the MAPK) after oil mixture exposure in the mantle of *M. edulis*.

Diesel oil is composed of 25% of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixture, the toxicity of which very structure-dependent, with isomers varying from being nontoxic to being extremely toxic. In hepatoma cells of human and mouse benzo[ $\alpha$ ]pyrene has been shown to affect the MAPK transduction pathway characterized by phosphorylation of both p38 and ERK1/2 in human (Chen et al., 2003) and c-jun N-terminal kinase 1 in mouse (Lei et al., 1998). This latter study promote the fact that benzo[ $\alpha$ ]pyrene induced apoptosis via a caspase-dependent pathway which may be independent of JNK activation. However, isomers of anthracene had opposite effect depending on their structure on ERK 1/2 activation (Rummel et al., 1999).

Comparing these results with DNA damage/integrity, it could be concluded that pp38 might play a role in DNA repair caused by diesel exposure which is reinforced at high concentrations with JNK activation.

#### 4.2. Field study—effects of environmental factors and pollution

It is important to consider the environmental parameters and especially salinity and temperature (freshwater-hypoosmotic stress) in biomonitoring studies (Hamer et al., 2008). Indeed, field studies showed a complexity of environmental impacts to marine organisms, and it is important to take this in consideration for definition of new biomarkers. For that reason, mussels collected at different stations along the Adriatic coast had been studied. The Adriatic sea, as a semi-enclosed part of the Mediterranean sea, is of great interest for the estimation and evaluation of the entry, extent, fate and effect of pollutants (Jaksic et al., 2005).

##### 4.2.1. Temperature

Our results revealed higher activation of the three MAP kinases during summer compared to winter. Our findings are in agreement with previously reported results (Anestis et al., 2007) indicating that mussels acclimated to high temperature for long-term showed an strong activation of the MAP kinases p38 and JNK. Indeed, during prolonged thermal stress, bivalves may readjust their metabolic profile and energy budget to meet the energy demand for Hsp synthesis. Anestis et al. (2007) showed that MAPK signaling might be involved in the regulation of Hsp expression in *Mytilus edulis*, like in mammalian system cells (Sheikh-Hamad et al., 1998; Rafiee et al., 2003). Indeed, *M. galloprovincialis* occurring in the intertidal zone

of the Adriatic coast in Croatia, is exposed to a wide range of environmental temperatures, from approximately 10 °C in winter (0 °C air temperature) to 27 °C in summer (35 °C air). Moreover, freshwater, coming at a temperature of 10 °C, induces strong variation of the water temperature during summer, and as a consequence, an increase of stress for the animals, compared to winter. In addition, the sampling could be also a source of stress to the mussels since in summer, they are exposed to 35 °C before their dissection. Our results showed a significant correlation between the temperature and the phosphorylation/activation of p38 and JNK during summer. In winter, the MAPKs were also activated but to a lesser extent than during summer.

#### 4.2.2. Salinity

During summer, the average salinity values were  $33.6(90\%) \pm 1.9$ , compared to  $23.8(63\%) \pm 2.6$ , in winter. Results showed in the Northern part that pp38 activity increased during both seasons, while JNK and ERK were activated only in winter, when temperature and salinity were lower. The responses of the p38 MAPK (or its yeast/fungal homologue HOG1) to osmotic and volume stresses have been documented in many organisms including yeasts, fungi (Zhang et al., 2002), sea urchin (Casano et al., 2003), fishes (Fiol and Kultz, 2007). Studies by Kultz and Avila (2001) probed the role of MAPKs in osmosensory signaling pathways in gills of the fish *Fundulus heteroclitus*. They demonstrated that the amount of phosphoenzyme of all three MAPKs increased significantly during hypoosmotic stress and, oppositely, decreased under hyperosmotic stress. These data demonstrate a key role for MAPKs in salinity adaptation.

#### 4.2.3. Pollution

Regarding the quality of the marine environment, our data showed the highest activation of the MAPKs in winter and in summer in the stations located in the Northern part of the Adriatic sea, comprising the areas of Pula, Rijeka and Zadar (Borik, Bailo, Bibinje). Indeed, the harbor of Pula, a very touristic region, acts as a sink for the fecal and urban waters of the area, together with industrial waste waters. The Rijeka Bay area is characterized by high industrial activities and large amount of urban and industrial waste waters is released into it. The sea currents are very limited and the aquatic system acts as a essentially closed system, with slow exchange of water masses. Concerning the Zadar area, urban and industrial (food processing plants) waste waters, with several short outflows are discharged (Jaksic et al., 2005). Previous studies reported that Kastela bay (Split region) and Vranjic location are quite polluted and environmentally stressed areas (Bihari et al., 2004). However, our results did not show high MAPK activity in these sites.

#### 4.3. Conclusive remarks and prospects for the use of protein of the stress signaling cascade as marker in biomonitoring studies

A new promising area for the investigation of biomarkers in ecotoxicological risk assessment is based on the use of proteins of the cell signaling. Since the role of MAPK has been recently well proven in mussels by Kefaloyianni et al. (2005), Anestis et al. (2007) and by the extensive work of Canesi et al. (2001, 2002a,b, 2003, 2004a,b, 2005, 2006), and in many other marine invertebrate as in an ascidian (Damiani et al., 2009), in a sea urchin (Casano et al., 2003), in the vertebrate fishes (Fiol and Kultz, 2005; Kultz and Avila, 2001) including the rainbow trout (Urushibara et al., 2009). Hence, as conserved proteins, the MAPKs may represent interesting biomarker since they play a central role in the response of organisms to a large range of stimuli. The advantages of MAPKs as biomarkers for environmental contamination, are that they give information about general conditions of health and provide early

warnings of intoxication, before complex functions are compromised. They are not specific to pollutants, since we showed that they are activated with many substances. However, the application of MAPKs requires certain caution since we have shown in this study that they are also strongly activated by natural environmental stressors, like salinity and temperature. In this study, we performed exposure to pollutants for 1 h. However, it is not possible to directly compare experimental results of a short time exposure with field studies. But the application of MAPK signaling pathway in biomonitoring can provide additional information of environmental stresses and accidental pollution (diesel and TBT) at investigated sites. Our suggestion is that the use of apoptotic biomarkers in combination with the MAPK could provide a better information to discriminate the responses to an anthropogenic stressor from those to a natural environmental factor. Therefore, future investigations are needed to establish a relationship between MAP kinase activation and apoptosis induction in mussels exposed to the same conditions.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (project 03F0451: cooperation project WTZ BRA – Health of marine ecosystems, and Center of Excellence BIOTECmarin), the Bundesministerium für Bildung und Forschung Germany (project “Center of Excellence BIOTECmarin”) and the International Human Frontier Science Program (RG-333/96-M). Hamer acknowledges Navigo sistem d.o.o. ([www.navigo-sistem.hr](http://www.navigo-sistem.hr)) for providing GPS AdriaROUTE and AdriaTOPO maps.

#### References

- Anestis, A., Lazou, A., Portner, H.O., Michaelidis, B., 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, 911–921.
- Batel, R., Vukmirovic, M., Bihari, N., Zahn, R.K., Muller, W.E., 1993. Nonradiometric detection of DNA crosslinks in mussel hemolymph by alkaline elution. *Anal. Biochem.* 212, 402–406.
- Betti, M., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Canonico, B., Falcioni, T., Gallo, G., Canesi, L., 2006. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) on *Mytilus* haemocytes: role of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biol. Cell.* 98, 233–244.
- Bihari, N., Hamer, B., Jaksic, Z., Fafandel, M., Micic, M., Batel, R., 2002. Application of alkaline elution, fast micromethod and flow cytometry in detection of marine contamination. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 48, 373–377.
- Blunt, B.C., Creek, A.T., Henderson, D.C., Hofmann, P.A., 2007. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activation of HSP25/27 protects desmin from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, 1518–1525.
- Böhm, M., Gamulin, V., Schröder, H.C., Müller, W.E., 2002. Evolution of osmosensing signal transduction in Metazoa: stress-activated protein kinases p38 and JNK. *Cell Tissue Res.* 308, 431–438.
- Burlando, B., Berti, E., Viarengo, A., 2006. Effects of seawater pollutants on protein tyrosine phosphorylation in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 78, 79–85.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Gallo, G., 2001. Insulin-like effect of zinc in *mytilus* digestive gland cells: modulation of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 60–66.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002a. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 57, 469–476.
- Canesi, L., Scarpato, A., Betti, M., Ciacci, C., Pruzzo, C., Gallo, G., 2002b. Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Mar. Environ. Res.* 54, 547–551.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G., 2003. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquat. Toxicol.* 63, 293–306.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Lorusso, L.C., Marchi, B., Burattini, S., Falcieri, E., Gallo, G., 2004a. Rapid effects of 17beta-estradiol on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 136, 58–71.
- Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Zampini, M., Gallo, G., 2004b. Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways. *Gen. Comp. Endocrinol.* 138, 58–69.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Gallo, G., Pruzzo, C., 2005. Interactions between *Mytilus* haemocytes and different strains of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1 El Tor: role of kinase-mediated signalling. *Cell. Microbiol.* 7, 667–674.

- Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Betti, M., Guarnieri, T., Tavoroli, S., Gallo, G., 2006. Immunomodulation by 17 $\beta$ -estradiol in bivalve hemocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R664–673.
- Carter, L.A., Tabor, M.B., Bonner, J.C., Bonner, L.A., 2002. Mitogen-activated protein kinase activation by oxidative and bacterial stress in an amphibian cell culture model. *Environ. Health Perspect.* 110, 641–645.
- Casano, C., Roccheri, M.C., Maenza, L., Migliore, S., Gianguzza, F., 2003. Sea urchin deciliation induces thermoresistance and activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Cell Stress Chaperones* 8, 70–75.
- Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Ceratto, N., Viarengo, A., 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 131, 447–455.
- Chen, S., Nguyen, N., Tamura, K., Karin, M., Tukey, R.H., 2003. The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 19526–19533.
- Collins, J.F., Brown, J.P., Alexeeff, G.V., Salmon, A.G., 1998. Potency equivalency factors for some polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 28, 45–54.
- Damiani, F., Gianguzza, M., Dolcemascolo, G., 2009. Effects of tributyltin chloride in scud embryos: modulation of kinase-mediated signalling pathways. *I.S.J.* 6, 87–94.
- Fabbri, E., Valbonesi, P., Franzellitti, S., 2008. HSP expression in bivalves. *I.S.J.* 5, 135–161.
- Fiol, D.F., Kultz, D., 2007. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *FEBS J.* 274, 5790–5798.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F., 2001. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquat. Toxicol.* 53, 19–32.
- Gaitanaki, C., Kefaloyianni, E., Marmari, A., Beis, I., 2004. Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Mol. Cell. Biochem.* 260, 119–127.
- Gundert-Remy, U., Dahl, S.G., Boobis, A., Kremers, P., Kopp-Schneider, A., Oberemm, A., Renwick, A., Pelkonen, O., 2005. Molecular approaches to the identification of biomarkers of exposure and effect—report of an expert meeting organized by COST Action B15. November 28, 2003. *Toxicol. Lett.* 156, 227–240.
- Hamer, B., Hamer, D.P., Müller, W.E., Batel, R., 2004. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environ. Int.* 30, 873–882.
- Hamer, B., Jaksic, Z., Pavicic-Hamer, D., Peric, L., Medakovic, D., Ivankovic, D., Pavicic, J., Zilberberg, C., Schröder, H.C., Müller, W.E., Smolaka, N., Batel, R., 2008. Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquat. Toxicol.* 89, 137–151.
- Hamer, B., Vucelic, V., Jaksic, Z., Pavicic-Hamer, D., Chatel, A., Wiens, M., Batel, R., 2009. Protein carbonyl groups in gills of the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of oxidative stress. In: 14th ISTA Symposium, METZ.
- Jaksic, Z., Batel, R., 2003. DNA integrity determination in marine invertebrates by Fast Micromethod. *Aquat. Toxicol.* 65, 361–376.
- Jaksic, Z., Batel, R., Bihari, N., Micic, M., Zahn, R.K., 2005. Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination—a long-term field study. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1314–1327.
- Kannan, K., Villeneuve, D.L., Blankenship, A.L., Giesy, J.P., 1998. Interaction of tributyltin with 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced ethoxyresorufin O-deethylase activity in rat hepatoma cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 55, 373–384.
- Karpiak, V.C., Bridges, R.J., Eyer, C.L., 2001. Organotins disrupt components of glutamate homeostasis in rat astrocyte cultures. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 63, 273–287.
- Kefaloyianni, E., Gourgou, E., Ferle, V., Kotsakis, E., Gaitanaki, C., Beis, I., 2005. Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *J. Exp. Biol.* 208, 4427–4436.
- Kimbrough, R.D., 1976. Toxicity and health effects of selected organotin compounds: a review. *Environ. Health Perspect.* 14, 51–56.
- Kultz, D., Avila, K., 2001. Mitogen-activated protein kinases are in vivo transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129, 821–829.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J., 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807–869.
- Lei, W., Yu, R., Mandlekar, S., Kong, A.N., 1998. Induction of apoptosis and activation of interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme/Ced-3 protease (caspase-3) and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 1 by benzo[a]pyrene. *Cancer Res.* 58, 2102–2106.
- Magi, E., Liscio, C., Pitarino, E., Santamaria, B., Di Carro, M., Tiso, M., Scaloni, A., Renzone, G., Cosulich, M.E., 2008. Interdisciplinary study for the evaluation of biochemical alterations on mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to a tributyltin-polluted area. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 671–678.
- Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., Sgro, M., Bolognesi, C., 2006. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environ. Pollut.* 142, 65–72.
- Malagoli, D., Lusvardi, M., Gobba, F., Ottaviani, E., 2004. 50 Hz magnetic fields activate mussel immunocyte p38 MAP kinase and induce HSP70 and 90. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 137, 75–79.
- Masuda, K., Shima, H., Katagiri, C., Kikuchi, K., 2003. Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446. *J. Biol. Chem.* 278, 32448–32456.
- Müller, W.E., Böhm, M., Grebenjuk, V.A., Skorokhod, A., Müller, I.M., Gamulin, V., 2002. Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans. *Gene* 295, 299–309.
- Müller, W.E.G., Custodio, M.R., Zilberberg, C., Châtel, A., Müller, I.M., Schröder, H.C., in press. Stem Cell Pattern in Porifera: Effect of Bacterial Infection. In: B. Rinkevich, V. Matranga (eds.). (Org.). Stem cell systems in invertebrates: Springer Science+Business Media.
- Park, J., Liu, A.Y., 2001. JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response. *J. Cell. Biochem.* 82, 326–338.
- Pelkonen, O., Nebert, D.W., 1982. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34, 189–222.
- Petrovic, S., Semencic, L., Ozretic, B., Ozretic, M., 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). *Mar. Pollut. Bull.* 49, 713–720.
- Pfeifer, S., Schiedek, D., Dippner, J., 2005. Effects of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 320, 93–105.
- Poonam, S., Paily, K.P., Balaraman, K., 2002. Oviposition attractancy of bacterial culture filtrates: response of *Culex quinquefasciatus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97, 359–362.
- Rafiee, P., Shi, Y., Pritchard Jr., K.A., Ogawa, H., Eis, A.L., Komorowski, R.A., Fitzpatrick, C.M., Tweddell, J.S., Litwin, S.B., Mussatto, K., Jaquiss, R.D., Baker, J.E., 2003. Cellular redistribution of inducible Hsp70 protein in the human and rabbit heart in response to the stress of chronic hypoxia: role of protein kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 43636–43644.
- Ranganna, K., Yousefipour, Z., Nasif, R., Yatsu, F.M., Milton, S.G., Hayes, B.E., 2002. Acrolein activates mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways in rat vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 240, 83–98.
- Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., Yaffe, M.B., 2007. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 11, 175–189.
- Roux, P.P., Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320–344.
- Rummel, A.M., Trosko, J.E., Wilson, M.R., Upham, B.L., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junctional intercellular communication and stimulated MAPK activity. *Toxicol. Sci.* 49, 232–240.
- Santovito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P., Albergoni, V., 2005. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 140, 321–329.
- Schröder, H.C., Batel, R., Hassanein, H.M., Lauenroth, S., Jenke, H., Simat, T., Steinhart, H., Müller, W.E., 2000. Correlation between the level of the potential biomarker, heat-shock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab, *Limanda limanda*: a field study in the North Sea and the English Channel. *Mar. Environ. Res.* 49, 201–215.
- Sheikh-Hamad, D., Di Mari, J., Suki, W.N., Safirstein, R., Watts 3rd, B.A., Rouse, D., 1998. p38 kinase activity is essential for osmotic induction of mRNAs for HSP70 and transporter for organic solute betaine in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 273, 1832–1837.
- Tanabe, S., Senthilkumar, K., Kannan, K., Subramanian, A.N., 1998. Accumulation features of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in resident and migratory birds from South India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 387–397.
- Urushibara, N., Mitsuhashi, S., Sasaki, T., Kasai, H., Yoshimizu, M., Fujita, H., Oda, A., 2009. JNK and p38 MAPK are independently involved in tributyltin-mediated cell death in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) RTG-2 cells. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 149, 468–475.
- Wada, T., Penninger, J.M., 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838–2849.
- White Jr., K.L., Kawabata, T.T., Ladics, G.S., 1994. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon immunotoxicity. In: Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E., Kimber, I. (Eds.), Immunotoxicology and Immunopharmacology, 2nd ed. Raven Press, New York, pp. 123–142.
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., Xu, J.R., 2002. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 532–538.